ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 8 Fascicule 1 1987

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12, RUE BUFFON, 75005 PARIS

PUBLICATION TRIMESTRIELLE



Mars 1987

SOMMAIRE

CONTENTS

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

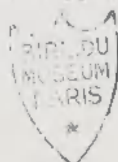
TOME 8 Fascicule 1 1987

Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM

DIRECTEUR DE LA PUBLICATION : Madame J. NICOT
SECRÉTAIRE DE RÉDACTION : Mme M.C. BOISSELIER. ÉDITEUR : A.D.A.C.

Publié avec le concours du Muséum National d'Histoire Naturelle

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE est indexé par : *Biological Abstracts, Current Contents,* Publications bibliographiques du CDST (Pascal).



HYPHOMYCÈTES AQUATIQUES
ÉTUDE DES VARIATIONS SAISONNIÈRES D'UNE POPULATION

par Jacques MERCÉ*

RÉSUMÉ — Étude des variations saisonnières de la flore fongique (Hyphomycètes aquatiques) d'un ruisseau de la région toulousaine, en relation avec l'activité sporogénique. Ce travail met en évidence l'importance de facteurs tels que la température de l'eau et l'apport de matière organique lié à la chute des feuilles.

SUMMARY — This is a study on the seasonal variation of fungi flora (Aquatic hyphomycetes) in a small river located near Toulouse, in relation with the sporogenic activity. This work underlines the importance of such environmental factors as water temperature and organic matter in put related to the litter production.

MOTS CLÉS : Mycologie, Hyphomycètes aquatiques, écologie.

Dans sa dernière publication, en 1977, Monsieur LORILLARD[1] indiquait : «Dans le but d'étudier les variations saisonnières de la quantité de spores d'hyphomycètes aquatiques, j'ai effectué des prélèvements d'écume hebdomadaires d'octobre 1975 à juin 1976, au ruisseau du Pont d'Auzil».

Il s'agit d'un ruisselet coupant la route D4, à 10 km au sud - sud-ouest de Toulouse, et à 2 km au nord de l'agglomération de Lacroix-Falgarde. D'une largeur moyenne de 50 cm, il draîne les eaux d'un vallon creusé dans les molasses toulousaines. Suivant les zones, le substrat rocheux constitué d'argiles, de marnes, de calcaires et de sables est plus ou moins riche en chacun de ces éléments.

---

(1) LORILLARD M. — 1977 — Hyphomycètes aquatiques, trois nouvelles espèces pour la France. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 113 (1-2) : 80-82.

Je tiens ici à remercier Monsieur Michel LORILLARD qui, après avoir quitté l'Université, m'a fait don de tous ses documents. La présente note a été rédigée d'après les résultats de ses prélèvements : les échantillons avaient été examinés au fur et à mesure de leur collecte, mais les résultats n'en avaient pas été publiés.

* Laboratoire Botanique et Forestier, Université Paul Sabatier, 39, allées Jules Guesde - 31062 Toulouse Cedex, France.

La présence de calcaire semble être à l'origine des faibles variations du pH. Ce dernier oscille aux environs de 7, entre 6,7 et 7,2. Les valeurs extrêmes se situent à 6,5 et 7,5.

Le régime des eaux, fortement tributaire des pluies, est très variable. Ce ruisseau est en général à sec de juillet à septembre, sauf après de très gros orages. En 1975, l'eau a commencé à couler d'une manière régulière vers la fin septembre. En hiver, le débit peut être très faible, mais ne semble jamais nul.

La partie supérieure du vallon est occupée par des cultures. Au niveau de la partie moyenne ce ruisseau traverse un bois de feuillus d'où provient l'essentiel de la matière végétale. Les essences les plus abondantes dont on trouve le plus souvent les feuilles dans l'eau sont, par ordre d'importance :

– sur les berges : *Alnus glutinosa, Salix alba.*

– dans le bois : *Quercus pedunculata, Quercus pubescens, Acer campestris, Sambucus nigra, Corylus avellana, Crataegus monogyna.*

Si des débris végétaux tombent dans l'eau toute l'année, l'essentiel de l'apport en matière organique a lieu à l'automne au moment de la chute des feuilles. Celle-ci a lieu d'octobre à décembre, l'essentiel de la défoliation se produisant en novembre.

Techniques utilisées

D'octobre 1975 à la fin juin 1976, il a été procédé à un prélèvement d'écume hebdomadaire, ainsi qu'à une mesure du pH et de la température de l'eau.

La détermination des espèces a été réalisée par observation microscopique dans une cellule de THOMAS, ce qui a permis l'examen de volumes connus d'échantillon. Les comptages et les identifications de spores ont été effectués sur 1 mm^3 d'eau provenant de la condensation de l'écume dans le bocal où on l'avait recueillie. L'écume récoltée étant plus ou moins dense, plus ou moins stable, le nombre de spores piégées est variable suivant les endroits, et les chiffres obtenus seraient difficilement comparables d'un relevé à l'autre. Pour palier cet inconvénient, les prélèvements ont été effectués, chaque fois, en récoltant en différents points du ruisseau, sur une centaine de mètres. Ces échantillons, qui occupent un volume important à l'état d'écume, sont mélangés une fois redevenus liquides. Les échantillons réalisés suivant cette méthode semblent assez représentatifs.

Dans la mesure où il a été effectué un prélèvement par semaine et où les différents résultats ont été regroupés par mois, les valeurs mensuelles obtenues sont un reflet assez exact de la réalité.

L'ensemble de ce travail a permis de mieux connaître deux aspects de la flore mycologique de ce ruisseau :

– d'une part, l'ensemble de ces relevés a permis de dresser un inventaire mensuel et annuel des espèces.

– d'autre part, l'étude de la quantité de spores émises donne une idée de l'importance et de la variation de l'activité de ces différents champignons au cours de l'année.

PREMIÈRE PARTIE
LA FLORE FONGIQUE
VARIATIONS DE LA COMPOSITION

I - Importance des variations et recherche des causes :

L'examen du tableau 1 montre que les 19 espèces inventoriées dans ce ruisseau ne sont pas présentes dans celui-ci tout au long de l'année. La figure 1 montre les variations du nombre d'espèces identifiées chaque mois, nombre variant de 5 à 12. Deux facteurs importants sont à l'origine de ces variations :

– L'apport de matière végétale.

Ce dernier, dû essentiellement aux feuilles mortes, a lieu en novembre, ce qui explique l'augmentation du nombre des espèces en décembre, 20 à 30 jours après. Ce décalage de 3 à 4 semaines apparaît nettement dans l'examen des relevés hebdomadaires. Cette matière végétale reste présente dans le ruisseau jusqu'au printemps.

– La température de l'eau.

Plusieurs auteurs ont déjà signalé l'importance de la température de l'eau

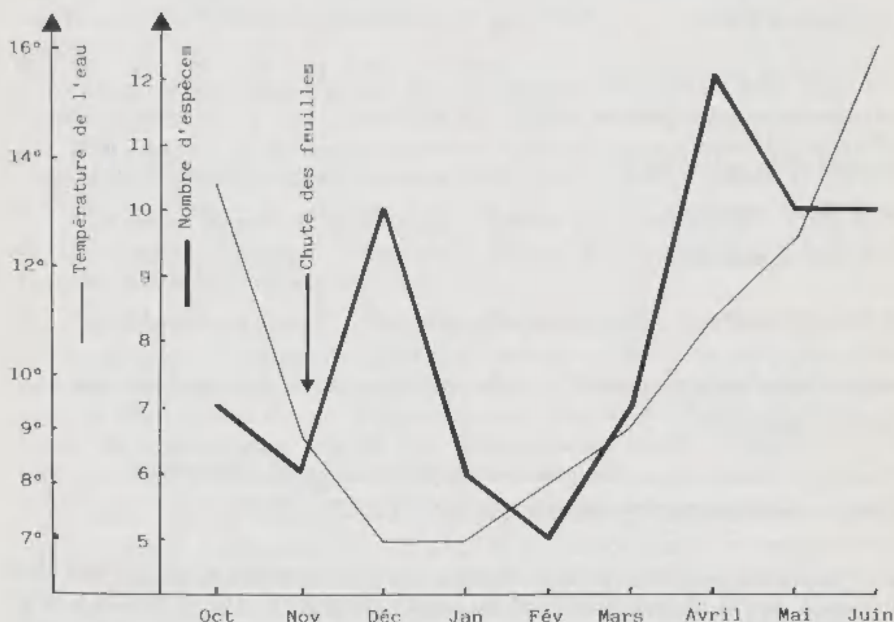


Figure 1 – Relation entre la température de l'eau et le nombre d'espèces observées chaque mois.

Figure 1 – Relationship between water temperature and species number observed every month.

	Oct	Nov	Déc	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin
Alatospora acuminata	2	2	93	57	17	36	48	83	30
Anguillospora crassa	+								
Anguillospora gigantea		+	7	4	+	2			
Anguillospora longissima			2			+	2	4	6
Anguillospora pseudolongissima			2				2	3	1
Articulospora moniliforma							+		
Bacillospora aquatica			+				+		
Clavatospora longibrachiata				+					
Clavatospora stellata			2			2	2	3	2
Clavatospora tentacula	3								2
Heliscus lugdunensis	2	+	12	11	9	32	41	24	10
Lemonniera aquatica			+						
Lemonniera terrestris							2	3	
Lunulospora curvula	+								
Tetracladium marchalianum	15	7	57	18	7	29	27	24	31
Tetracladium maxilliformis							+		
Tetracladium setigerum								3	4
Tricladium angulatum	2	7	50	15	2	26	36	40	33
Tricladium splendens		+					3	3	4
Nombre d'espèces 19	7	6	10	6	5	7	12	10	10
Nombre total de spores par mm3 d'échantillon	24	16	229	105	35	127	163	190	123

Tableau 1 – Nombre de conidies observées chaque mois par mm^3 d'échantillon.
Table 1 – Conidium number observed every month per mm^3 sample.

sur l'activité fongique et sur la production des spores (HYNES, 1972; FISHER & LIKENS, 1973; IQBAL & WEBSTER, 1973; IVERSEN, 1973; SUBERKROPP & KLUG, 1976; GONCZOL, 1976; BARLOCHER & KENDRICK, 1974, 1976) et, sur ce même ruisseau, LORILLARD (1974a, b).

Sur la figure 1, j'ai indiqué, en plus du nombre d'espèces identifiées chaque mois, la température moyenne de l'eau.

L'abaissement des températures en décembre se traduit dès janvier par une diminution du nombre des espèces encore en activité. Le phénomène se poursuit en février. On observe, sur le graphique, le décalage d'un mois qui existe entre les deux courbes, décalage qui se poursuit à la fin de l'hiver et au printemps.

Le nombre des espèces atteint son maximum en avril, dès que l'eau se réchauffe et dépasse les 9°C, ce qui fut le cas cette année là dès le mois de mars. On assiste ensuite à une légère diminution du nombre des espèces présentes, ainsi qu'à un ralentissement de leur sporogénèse, phénomène que nous étudierons dans la deuxième partie. La température de l'eau n'est plus seule en cause, le stock de matière végétale disponible diminue rapidement, ceci pour plusieurs raisons :

- la décomposition de la matière est déjà très avancée,
- la microfaune aquatique en a utilisé une grande partie,
- les crues de printemps entraînent beaucoup de débris végétaux et diminuent ainsi considérablement la quantité de substrat utilisable par les hyphomycètes, ce qui limite leur développement.

II - Période d'activité des différentes espèces

— Certaines espèces, présentes toute l'année, s'observent dans la plupart des relevés. C'est le cas de : *Alatospora acuminata* Ingold, *Heliscus lugdunensis* Sacc. et Therry, *Tetracladium marchalianum* de Wild., et *Tricladium angulatum* Ingold.

— D'autres sont éliminées par des températures trop basses. Ainsi des températures supérieures à 8-9°C semblent nécessaires à : *Anguillospora longissima* (de Wild.) Ingold, *Anguillospora pseudolongissima* Ranz, *Clavatospora stellata* (Ingold et Cox) Nilson ex Marvanova et Nilson, et *Tricladium splendens* Ingold.

— Certaines espèces semblent être nettement plus thermophiles. C'est le cas de *Clavatospora tentacula* (Umphlett) Nilsson qui n'apparaît que lorsque la température de l'eau est supérieure à 12°C.

— A l'opposé une espèce comme *Anguillospora gigantea* Ranzoni disparaît des relevés dès que la température de l'eau est supérieure à 10°C. Il se peut que des températures supérieures ne soient pas défavorables au développement du champignon, mais qu'elles deviennent un facteur limitant pour la sporulation. A moins que l'arrêt de la sporulation soit dû à la disparition de certains éléments nutritifs indispensables à ce champignon.

— Deux espèces : *Lemonniera terrestris* Tubaki et *Tetracladium setigerum* (Grove) Ingold, n'apparaissent qu'à la fin du printemps, quand la température de l'eau est supérieure à 10-11°C. Cependant, il n'est pas certain que les basses températures soient seules en cause comme facteur limitant. Si c'était le cas, ces champignons se développeraient aussi à l'automne, quand les eaux ne sont pas encore froides, à moins que leur développement soit trop lent pour qu'ils aient le temps de sporuler. Il est possible aussi qu'ils ne puissent s'installer sur le matériel végétal frais, et qu'ils recherchent des débris déjà partiellement dégradés.

– Plusieurs champignons n'apparaissent que çà et là dans les relevés, trop rarement pour que l'on puisse en tirer des conclusions. Ces espèces peuvent être qualifiées de sporadiques. C'est le cas de : *Anguillospora crassa* Ingold, *Articulospora moniliforma* Ranz, *Bacillospora aquatica* Nilsson, *Clavatospora longibrachiata* (Ingold) Nilsson ex Marvanova et Nilsson, *Lemonniera aquatica* de Wild., *Lunulospora curvula* Ingold, et *Tetracladium maxilliformis* (Rost.) Ingold.

DEUXIÈME PARTIE
L'ACTIVITÉ SPOROGÉNIQUE
ET SES VARIATIONS MENSUELLES

I - Étude globale.
Relations avec l'apport de matière organique et la température de l'eau.

L'examen de la figure 2 montre que la quantité de spores observée dans 1 mm^3 d'écume varie beaucoup selon les mois. Faible en octobre et novembre, le nombre de spores augmente brutalement en décembre, diminue jusqu'en février,

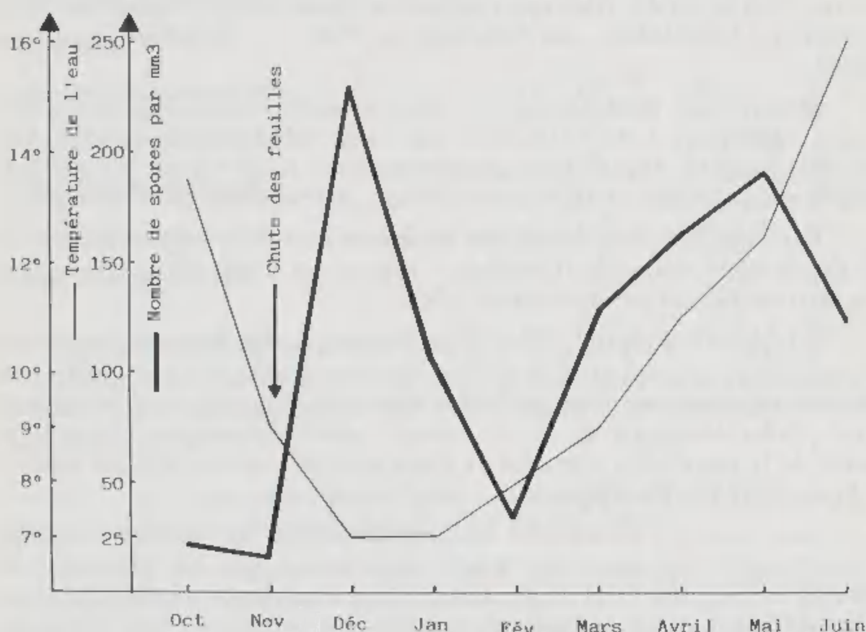


Figure 2 – Relation entre la température de l'eau et le nombre de spores observées par mm^3 d'échantillon.

Figure 2 – Relationship between water temperature and spore number observed every month per mm^3 sample.

puis réaugmente de mars à mai pour diminuer en juin. Ces variations sont étroitement liées aux deux facteurs déjà cités dans la première partie, à savoir la chute des feuilles et les variations de la température de l'eau.

La chute des feuilles représente l'apport essentiel de matière végétale. Un mois après, le nombre de spores augmente dans des proportions très importantes : de 16 à 229, soit 14 fois plus. Dans le même temps, on passe de 6 à 10 espèces soit environ 2 fois plus. Le phénomène marquant n'est pas tellement l'augmentation du nombre des espèces que l'accroissement de l'activité sporogène des champignons. L'examen du tableau 1 montre que ce sont les hyphomycètes déjà présents en octobre et novembre qui voient leur sporulation augmenter brutalement. Ceux qui apparaissent à ce moment là ne sont que très faiblement représentés.

– Les variations de la température de l'eau influencent fortement la production des spores. En octobre, cette température est relativement élevée (13,5°C), mais le nombre de spores reste réduit. En novembre, au moment de la chute des feuilles, l'abaissement de la température à 9°C n'empêche pas l'activité des champignons de devenir importante à la faveur de l'apport de matière végétale. Cela se traduit, 20 à 30 jours après, par une forte production de spores.

Les températures assez basses des eaux en décembre et janvier entraînent une réduction de l'activité fongique, qui reprend dès que la température s'élève. Il faut noter, ici aussi, le décalage d'environ un mois qui existe entre un phénomène stimulant (apport de matière végétale) ou inhibant (abaissement de la température) et la production des spores. Ainsi les basses températures de l'eau de décembre et janvier se traduisent par une diminution d'activité en janvier et février.

L'augmentation régulière des températures au cours des mois suivants se traduit par une reprise de l'activité des champignons, ce que nous observons jusqu'en mai. La baisse enregistrée en juin peut être attribuée comme je l'ai indiqué dans la première partie, à une diminution des stocks de matière organique disponible en raison de la dégradation réalisée par les champignons et par la faune aquatique et du nettoyage opéré par les crues.

II - Examen de quelques cas particuliers.

BÄRLOCHER & KENDRICK (1981), ainsi que d'autres auteurs, distinguent deux parties dans la masse végétale qui tombe dans l'eau et qui constitue la source de nourriture pour les hyphomycètes :

– une partie dure, difficile à dégrader, composée de débris de bois, des pétioles et des nervures des feuilles.

– une partie tendre, facile à utiliser, constituée essentiellement par les limbes des feuilles. Cette fraction, plus nutritive, contient moins de cellulose, de lignine, de tannins, etc... et plus de protéines. C'est elle qui est également la première utilisée par toute la microfaune aquatique.

Ces auteurs ont observé que certaines espèces se développent préférentiellement sur l'un ou l'autre des substrats. Ainsi *Tricladium angulatum* prolifère très

rapidement sur les limbes et légèrement sur les nervures. Au bout de 2 à 3 semaines, ce champignon s'avère très abondant alors qu'*Heliscus lugdunensis*, qui semble se limiter aux parties dures n'a qu'un développement réduit. Au bout de 3 mois, les parties tendres (limbe) ont disparues, dégradées par *Tricladium* et consommées par la microfaune. Ce champignon devient de plus en plus rare alors qu'*Heliscus lugdunensis*, cantonné sur les parties dures, devient, lui, de plus en plus abondant.

Les observations sur le ruisseau de Ramade confirment celles réalisées par BÄRLOCHER & KENDRICK (1975, 1976, 1981) dans des rivières aux eaux plus froides (Suisse, Canada).

— ***Heliscus lugdunensis.***

L'examen du tableau 1 et de la figure 3 montre que ce champignon, présent toute l'année, est assez peu stimulé par l'apport de matière organique. L'hiver, son activité semble ralentie par l'abaissement de la température de l'eau. La production de spores devient importante en mars et avril, puis diminue rapidement. L'étude des quantités de spores émises montre que ce champignon a besoin de plusieurs mois pour dégrader la matière végétale et pour fructifier.

La diminution du nombre de spores en mai et juin est liée en grande partie à la diminution du stock de matière organique.

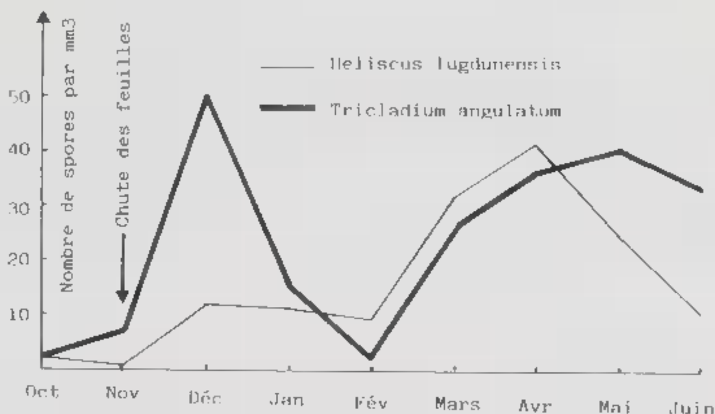


Figure 3 — Nombre de spores d'*Heliscus lugdunensis* et de *Tricladium angulatum* observées chaque mois.

Figure 3 — *Heliscus lugdunensis* and *Tricladium angulatum* spore number observed every month.

— ***Tricladium angulatum.***

L'examen du tableau 1 et de la figure 3 montre que ce champignon, présent toute l'année, se développe très rapidement après l'apport de matière organique.

La production de spores devient très importante en décembre (l'examen des relevés hebdomadaires montre qu'elle augmente dès la fin novembre et culmine début décembre), diminue fortement durant la période froide (janvier et février) et redevient importante au printemps dès que la température de l'eau dépasse 8 à 9°C.

Le maximum de décembre est dû au fait que ce champignon se développe surtout sur les limbes des feuilles (BÄRLOCHER & KENDRICH, 1981). L'attaque de ces parties tendres est facile, ce qui permet au champignon d'atteindre très vite un développement important.

Le maximum du printemps est plus difficile à expliquer : les feuilles sont déjà fortement dégradées et les limbes ont en grande partie disparus. Je pense que ce champignon doit s'attaquer alors à d'autres fragments végétaux.

— ***Tetracladium marchalianum.***

L'examen du tableau 1 et de la figure 4 montre une courbe semblable à celle de *Tricladium angulatum*. Comme *Tricladium, Tetracladium* doit se développer rapidement à l'automne sur les limbes des feuilles, et utiliser au printemps les débris végétaux restant.

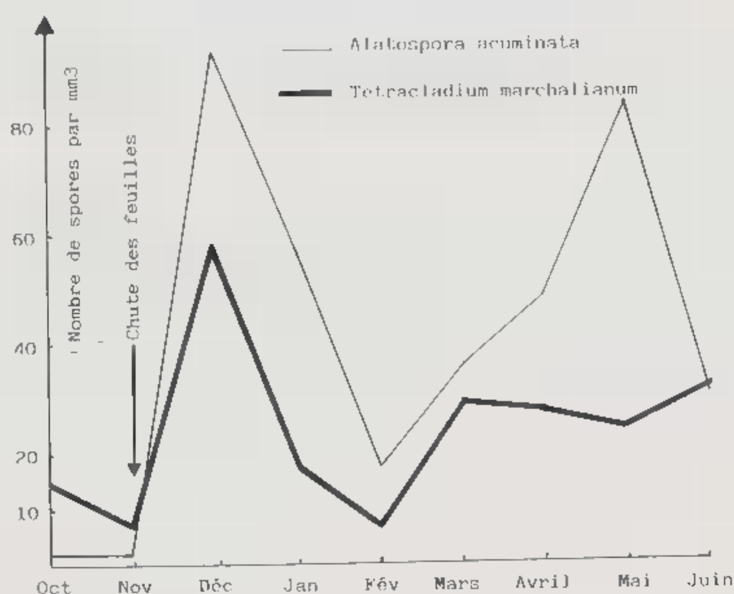


Figure 4 — Nombre de spores d'*Alatospora acuminata* et de *Tetracladium marchalianum* observées chaque mois.

Figure 4 — *Alatospora acuminata* and *Tetracladium marchalianum* spore number observed every month.

Ces deux champignons semblent avoir des exigences écologiques et des rythmes d'activité semblables.

— *Alatospora acuminata.*

L'examen du tableau 1 et de la figure 4 montre que cette espèce est présente dans tous les relevés. Peu abondant au début de l'automne, ce champignon voit son activité augmenter très fortement après la chute des feuilles. Les basses températures ralentissent la production des spores, qui reste cependant soutenue. Le nombre de spores observées en mai est presque aussi important que celui de décembre. La baisse observée en juin est en relation avec la diminution du stock de matière organique. Comme *Tricladium angulatum* et *Tetracladium marchalianum*, cet hyphomycète doit se développer préférentiellement sur les limbes, puis attaquer ensuite la matière végétale restante.

— J'ai signalé, dans la première partie qu'un certain nombre d'espèces étaient éliminées par des températures inférieures à 8-9°C. C'est le cas de : *Anguillospora longissima, Anguillospora pseudolongissima, Clavatospora stellata,* et *Tricladium splendens.*

L'examen du tableau 1 montre que le nombre de spores observées reste toujours très faible, surtout si on le compare aux valeurs trouvées pour les espèces précédentes.

CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude basée sur 40 relevés réalisés pendant neuf mois sont les suivants :

1 - Le nombre important des relevés a permis de dresser une liste assez complète des espèces vivant dans ce ruisseau (actuellement, 19 espèces recensées).

2 - La fréquence des relevés a permis d'étudier le rythme d'activité des différentes espèces en faisant ressortir le rôle prépondérant de quatre d'entre elles : *Alatospora acuminata, Heliscus lugdunensis, Tetracladium marchalianum* et *Tricladium angulatum.*

3 - Nous avons mis en évidence l'importance de la période de chute des feuilles. En fournissant une masse de matière organique, la défoliation des arbres permet le développement d'un grand nombre d'espèces.

4 - Nous avons également précisé le rôle joué par la température de l'eau, ainsi que le décalage (de l'ordre du mois) qui existe entre les variations de la température et l'apparition ou la disparition de certains hyphomycètes.

BIBLIOGRAPHIE

BÄRLOCHER F. and KENDRICK B., 1974 — Dynamics of the fungal populations on leaves in a stream. *J. Ecol.* 62 : 761-791.

BÄRLOCHER F. and KENDRICK B., 1975 – Leaf-conditionning by microorganisms. *Oecologia* 20 : 359-362.

BÄRLOCHER F. and KENDRICK B., 1976 – Hyphomycetes as intermediaries of energy flow in streams. *In* : E.B.G. JONES, *Recent advances in Aquatic Mycology*. London, Elek : 435-446.

BÄRLOCHER F. and KENDRICK B., 1981 – The role of aquatic hyphomycetes in the trophic structure of streams. *In* : T.D. WICKLOW & G.C. CARROL, *The fungal community : its organisation and role in the ecosystem*. New York, M. Dekker : 743-760.

FISHER S.G. and LIKENS G.E., 1973 – Energy flow in Bear Brook, New Hampshire : an integrative approach to stream ecosystem metabolism. *Ecol. Monogr.* 43 : 421-439.

GÖNCZÖL J., 1976 – Ecological observations on the aquatic hyphomycetes of Hungary. II. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 22 : 51-60.

HYNES H.B.N., 1970 – *The ecology of Running waters*. Toronto, Univ. of Toronto Press, 555 p.

IQBAL S.H. and WEBSTER J., 1973 – Aquatic hyphomycete spora of the river Exe and its tributaries. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 61 : 331-346.

IVERSEN T.M., 1973 - Decomposition of autumns - shed leaves in springbrook and its significance for the fauna. *Arch. Hydrobiol.* 72 : 305-312.

LORILLARD M., 1974a – Hyphomycètes aquatiques de la région toulousaine. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 110 : 82-87.

LORILLARD M., 1974b - Hyphomycètes aquatiques : nouvelles récoltes et variations saisonnières. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 110 : 241-244.

LORILLARD M., 1977 - Hyphomycètes aquatiques : trois espèces nouvelles pour la France. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse* 113 : 80-82.

SUBERKROPP K. and KLUG J.M., 1976 – Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. *Ecology* 57 : 707-719.

INFLUENCE OF PREFIXATION IN THE STUDY OF THE STRUCTURE OF SYMBIONTS OF *LOBARIA* SPP.

by C. ASCASO and S. RAPSCH*

SUMMARY. — In plants in general, the type of buffer used in fixation is apparently more important for changes in ultrastructural preservation than the type of fixing solution. In lichen thalli, it has been observed that glutaraldehyde used with phosphate buffer produces artefacts in the *Myrmecia* algal cells. The aim, therefore, was to determine whether these changes occur with different buffer concentrations, and to find another fixation method that does not produce these artefacts. In the present study, different concentrations of phosphate buffer are tried while the occurring ultrastructural changes are observed. The most important are cellular plasmolysis, presence of dense bodies that sometimes have a myelinic shape in the cytoplasm, and presence of dense half-moon structures near the plasmalemma. These changes occur from the lowest to the highest buffer concentration. Faced with the necessity to discard the buffer as a fixing vehicle in certain lichen thalli with *Myrmecia* phycobiont, the use of glutaraldehyde in bidistilled water is tested in two different conditions. This fixing procedure is fairly optimal when the algal symbiont is studied, whereas fixation in glutaraldehyde-buffer is more appropriate for the fungal component.

RÉSUMÉ. — Dans les plantes en général, pour la préservation des changements ultrastructuraux, le type de tampon utilisé pour la fixation est apparemment plus important que le type de solution de fixation. Pour les thalles lichéniques, il a été observé que la glutaraldéhyde utilisée avec du tampon phosphate, produit des artéfacts dans les cellules algales de *Myrmecia*. Il faut donc déterminer si ces changements apparaissent avec des concentrations différentes de tampon et trouver une autre méthode de fixation ne produisant pas d'artéfacts. Dans cette étude, différentes concentrations de tampon phosphate ont été essayées et nous avons observé les changements structuraux en résultant. Les changements les plus importants sont des plasmolyses cellulaires , la présence de corps denses présentant parfois une forme myélinique dans le cytoplasme, et la présence de structures denses en demi-lune près du plasmalemme. Leur apparition est corrélée avec l'augmentation de la concentration du tampon. Face à la nécessité d'éliminer le tampon pour la fixation de certains thalles lichéniques ayant le *Myrmecia* comme phycobionte, nous avons testé la glutaraldéhyde dans l'eau bidistillée sous deux conditions différentes. Cette méthode de fixation est optimale lorsque le symbionte algal est étudié, tandis que la fixation par la glutaraldéhyde dans le tampon est plus appropriée pour le composant fongique.

KEY WORDS : ultrastructure, glutaraldehyde, lichenized fungi, *Lobaria*, *Myrmecia*, mycobiont, phycobiont.

* Instituto de Edafoligía y Biología Vegetal, c/ Serrano nº 115 bis. 28006 Madrid (Spain).

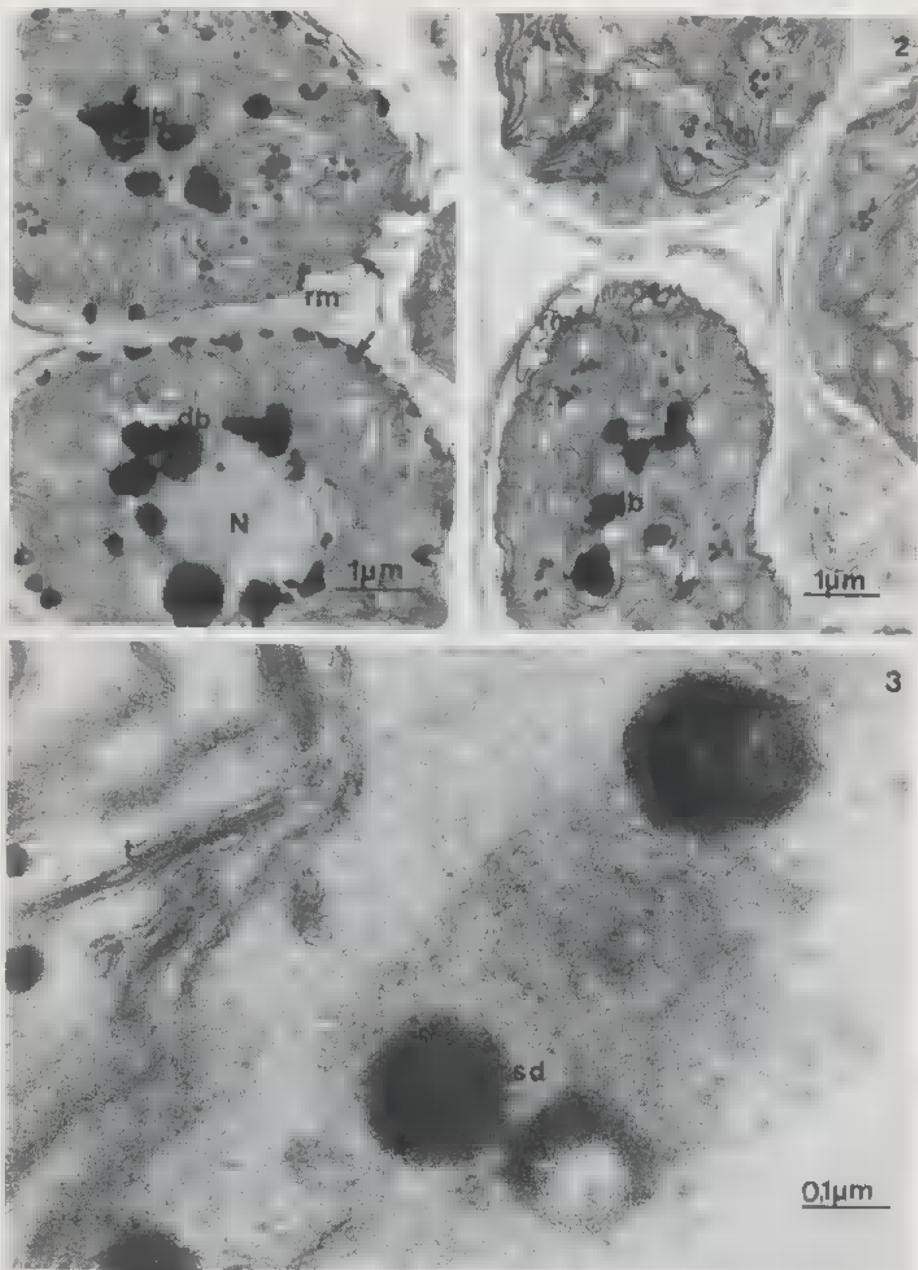


Plate 1 – Phycobiont (*Myrmecia*) in *Lobaria amplissima*. 1 : Samples fixed in glutaraldehyde in Sorensen buffer 0.2 pH 7.2. Note : half-moon structures beneath plasmalemma (arrows). 2 : Samples fixed in glutaraldehyde in Sorensen buffer 0.1 M pH 7.2. 3 : Samples fixed in glutaraldehyde in Sorensen buffer 0.05M pH 7.2. Note the presence of the storage droplets at the bottom.

Symbols – db : dark body, N : nucleus, rm : remainder membrane, sd : storage droplet.

INTRODUCTION

Few researchers have directed their attention to the development of appropriate methods to process plant material for transmission electron microscopy (COETZEE & VAN DER MERWE, 1984). During fixation, the differential permeability of the cell membranes decreases (IQBAL & WEAKLEY, 1974) and the presence of the pressure potential in plant cells may cause the loss of cell substance through this fixed membrane if enough pressure gradients exist. With plants in general, it seems that the type of buffer used for fixation is apparently more important in ultrastructural preservation than the type of fixing solution used (GOODCHILD & CRAIG, 1982).

In the preparation of lichen thalli for TEM, HOLOPAINEN (1982) observed that the effect of phosphate buffer concentration on ultrastructure varies with the time of the year. ASCASO & al. (1985) found that glutaraldehyde at 3.25 % in phosphate buffer 0.05M produced changes in the ultrastructure of *Myrmecia* in *Lobaria amplissima*, which did not appear when the thallus was fixed in glutaraldehyde of the same concentration in water. These changes include varying size and density of the plasmalemma particles.

Before definitively discarding phosphate buffer as a vehicle for the glutaraldehyde fixing solution, the aim of the present study is to determine the influence of the buffer at different concentrations on the *Myrmecia* phycobiont in two lichen thalli. After observing (ASCASO & al., 1985) that the fixation in glutaraldehyde-water seems to be the most adequate, two different types of fixation were tried to decide upon the most appropriate.

MATERIAL AND METHOD

Thalli of *Lobaria amplissima* (Scop.) Forss. and *L. pulmonaria* (L.) Hoffm. were collected in April in Montejo de la Sierra near Madrid (Spain). The lichen samples were transported to the laboratory in polythene bags and immediately prefixed. The % water content by weight was 40 % and 35 % respectively, immediately prior to fixation.

Small sections of thalli, from 2-3 mm behind the lobe tips, were cut into small pieces and placed in 3.25 % glutaraldehyde in either 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M phosphate buffer SORENSEN pH 7.2 or in distilled water. The fixation in glutaraldehyde with distilled water was made at the resulting pH 3.9 or after increasing the pH of the solution to 7.2.

Planche I — Phycobionte (*Myrmecia*) du *Lobaria amplissima*. 1 : Échantillons fixés par la glutaraldéhyde dans le tampon Sorensen 0,2M pH 7,2. Noter les structures en demi-lunes au-dessus du plasmalemme (flèches). 2 : Échantillons fixés par la glutaraldéhyde dans le tampon Sorensen 0,1M pH 7,2. 3 : Échantillons fixés par la glutaraldéhyde dans le tampon Sorensen 0,05M pH 7,2. Noter la présence de gouttelettes de réserve en bas. Symboles — db : corps noir, N : noyau, rm : membrane résiduelle, sd : gouttelette de réserve.

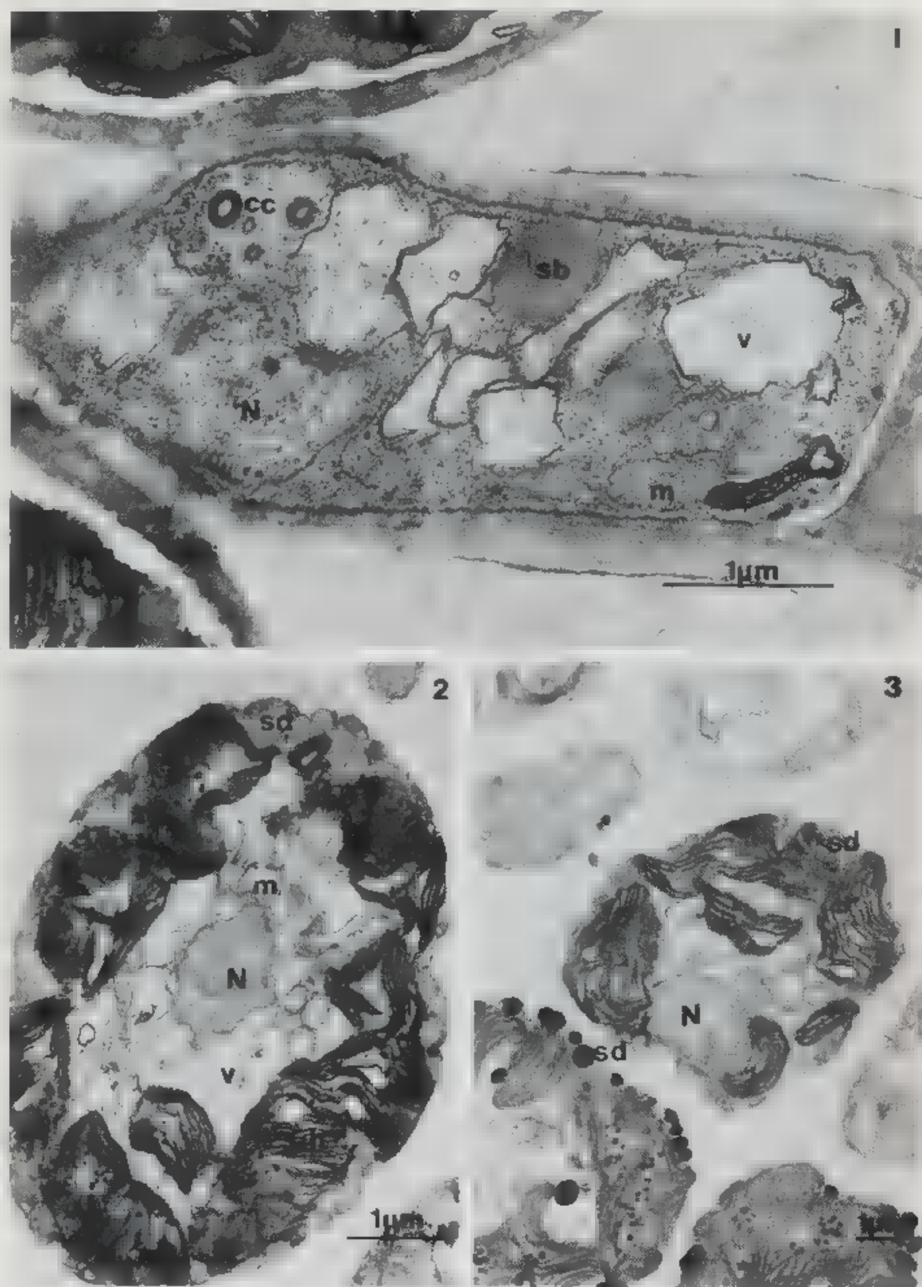


Plate II — 1 : Mycobiont in *Lobaria amplissima*. Samples fixed in glutaraldehyde in Sorensen buffer 0.1M. 2 : Phycobiont (*Myrmecia*) in *Lobaria amplissima*. Samples fixed in glutaraldehyde in distilled water. 3 : The same sample as in fig. 2, but fixed in glutaraldehyde-water at pH 7.2. Symbols — cc : concentric body, Ch : chloroplast, m : mitochondria, N : noyau, sb : storage body, sd : storage droplet, v : vacuole.

This prefixation was carried out at 4°C for 3 hours. The samples were then washed overnight in the corresponding buffer or water and postfixed in 1 % osmium tetroxide, dehydrated in 30 %, 50 %, 70 % and 100 % ethanol, embedded in SPURR resin (1969), sectioned and stained with REYNOLDS lead citrate (1963). Ultrathin sections were examined with the Philips EM 300 electron microscope. For image analysis, a MOP-Videoplan (Kontron) semiautomatic image analyser was used.

RESULTS AND DISCUSSION

The samples fixed in glutaraldehyde with 0.2 M buffer, show remarkable changes in the cytoplasm of the algal symbiont *Myrmecia* (pl. I, 1), both in the *Lobaria amplissima* and the *L. pulmonaria* thalli. In the cytoplasm area between the chloroplastic membrane and the nucleus, many dense bodies appear, some of which, when observed closely, look like myelinic shapes. Next to the plasmalemma, there are electron-dense structures that take the form of half-moons. A high degree of cell plasmolysis is also observed, and in some areas, there are membraneous remains in the empty space between the plasmalemma and the wall, which is a consequence of the plasmolysis. There also seems to be a certain degree of weakening (or perhaps disorganization) of the thylakoid laminas inside the chloroplast.

When glutaraldehyde diluted in 0.1 M buffer is used, the results obtained for the phycobiont (pl. I, 2) are similar, though of greater intensity since the different algal cells are affected in different ways.

The ultrastructural preservation is not adequate even when the buffer is used at a concentration of 0.05 M. In this case, there are fewer half-moon structures near the plasmalemma, while sizable storage droplets with high electronic density (pl. I, 3) are found. In the cytoplast spaces near the chloroplast still appear structures similar to myelinic shapes.

These changes seem to be due to movements of cell lipids in the phycobiont caused by the prefixation with buffer as a vehicle for glutaraldehyde. The lipids are stirred up during prefixation and are later fixed in the course of post-fixation with osmium tetroxide. As they are placed in certain areas of the cytoplasm, they give rise to the type of artefacts observed.

This is as far as the cell lipids are concerned. The effect that may exist on sugars, aminoacids and proteins is not known. According to COETZEE & VAN

———

Planche II — 1 : Mycobionte du *Lobaria amplissima*. Échantillons fixés par la glutaraldéhyde dans le tampon Sorensen 0,1 M. 2 : Phycobionte (*Myrmecia*) du *Lobaria amplissima*. Échantillons fixés par la glutaraldéhyde dans l'eau distillée. 3 : Même échantillon que la fig. 2, mais fixé par la glutaraldéhyde dans l'eau, à pH 7,2. Symboles - cc : corps concentrique, Ch : chloroplaste, m : mitochondrie, N : noyau, sb : corps de réserve, sd : gouttelette de réserve, v : vacuole.

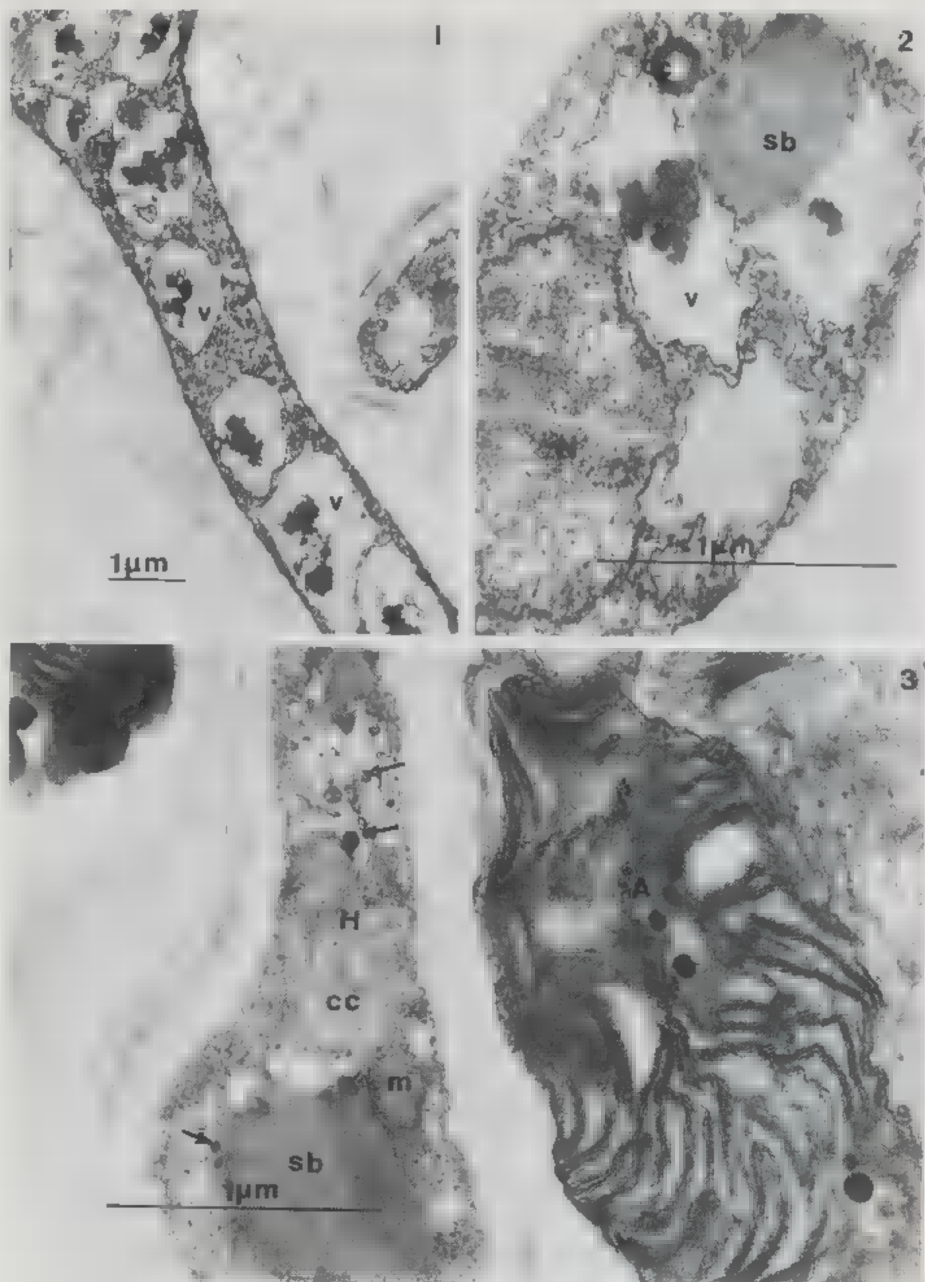


Plate III – 1 : Mycobiont in *Lobaria amplissima* fixed in glutaraldehyde in distilled water. 2 : Detail of the sample. 3 : Mycobiont in *Lobaria pulmonaria*. Note the dots or little globules in the cytoplasm (arrows). Fixed [illegible] in fig. 1. Symbols : A : Algae, cc : concentric body, H : hyphae, m : mitochondria, N : nucleus, sb : storage body, v : vacuole.

DER MERWE (1984), the Na-Na phosphate buffer, even if it produces the lowest extraction per cent, induces a certain degree of extraction in these substances.

The half moon structures appear more frequently with increase of the buffer concentration; they seem to be very similar in electronic density and form to the dark polyphosphate bodies observed by HOLOPAINEN (1981) in *Trebouxia* of *Alectoria capillaris*. It is probable that the similarity between both structures is due not only to morphological but to chemical composition as well since if the dark polyphosphate bodies have a high phosphorus content, it may also be high in the half-moon structures in *Myrmecia* fixed with phosphate buffer.

In opposition to what was observed in algal cells, the general resolution of the organelles in the fungal cells is good in the ultrastructural study carried out with glutaraldehyde in phosphate buffer (pl. II, 1). No changes in the nucleus, mitochondria, vacuoles or cytoplasmic storage bodies seem to exist. The concentric bodies also have a normal appearance.

In samples prefixed in glutaraldehyde in bidistilled water, the phycobiont appears as shown in plate II, 2. No movement of lipids during prefixation is perceptible that may produce myelinic structures, nor are there half-moon structures near the plasmalemma. The thylakoid laminas look normal, as well as the reserve bodies found near the plasmalemma. In the area near the nucleus, there are vacuoles and mitochondria. These have an empty space inside which is surrounded by mitochondrial crests.

These results are similar to the ones obtained for the same species of *Myrmecia* phycobiont in other studies, in which a similar prefixation procedure was tested (ASCASO & al., 1985; ASCASO & al., 1986). As it can be observed in all microphotographs, there is no important cell plasmolysis.

When the same fixation is carried out on the samples, but raising the pH of the glutaraldehyde-water mixture to 7.2, the ultrastructural preservation is the one shown in plate II, 3. Through simple observation by TEM, this preservation (pl. II, 3) does not appear to be as good as the previous one (pl. II, 2), among other reasons, because of the electron-dense appearance of the storage droplets near the plasmalemma. Image analysis techniques were used to quantify these results (Tab. 1).

Raising the pH to 7.2 in the glutaraldehyde-water mixture causes greater plasmolysis (2.8 μm^2 of space between plasmalemma and wall) as was found in the glutaraldehyde - distilled water mixture. In the first case, the size of the protoplast also increases. There are some dense bodies in the cytoplasm (2.77 %) as well as half-moon structures under the plasmalemma (5.65 %).

Planche III — 1 : Mycobionte du *Lobaria amplissima* fixé par la glutaraldéhyde dans l'eau distillée. 2 : Détail du même échantillon. 3 : Mycobionte du *Lobaria pulmonaria*. Noter les taches ou les petits globules dans le cytoplasme (flèches). Même fixation que pour la fig. 1. Symboles — A : Algue, cc : corps concentrique, H : hyphe, m : mitochondrie, N : noyau, sb : corps de réserve, v : vacuole.

	Glut+H_2O pH. 3.9	Glut+H_2O pH.7.2	P $\leq$
Average area of protoplast (μm^2).	21.8$\pm$6.4	26.4$\pm$8.6	0.0
Area between plasmalemma and wall (μm^2)	1.1$\pm$0.4	2.8$\pm$1.4	0.0
Storage body area as per cent of protoplast area	5.07	4.38	
Dark body (1) area as per cent of protoplast area		2.77	
Half-moon shaped bodies under plasmalemma		5.65	

Table I — Measures of the different parameters in *Myrmecia* of *Lobaria amplissima*, prefixed in glutaraldehyde in water at resulting pH, or at pH raised to 7.2. (1) Myelinic shapes.

Tableau I - Mesures des différents paramètres pour le *Myrmecia* du *Lobaria amplissima*, préfixé par la glutaraldéhyde dans l'eau, au pH résultant, ou à pH 7,2. (1) Formes myéliniques.

This indicates that prefixation in glutaraldehyde-water is worse when the pH of the mixture is raised to 7.2. There seems to be a relationship between the presence of storage droplets and of half-moon structures. When the fixation is not very good, as in the case of glutaraldehyde-water pH 7.2, or is bad, as in the case of glutaraldehyde-buffer, the amount of structures counted as storage droplets becomes lower, while half-moon structures appear under the plasmalemma. This seems to indicate that the reserve bodies collapse, are transformed and become denser when fixation is bad.

Thus, the most appropriate fixation for the *Myrmecia* phycobiont in these thalli is glutaraldehyde-distilled water.

The effect of this type of fixation on the lichen mycobiont has been studied. In the mycobiont of *L. amplissima*, a vesiculation is observed all along the hypha (pl. III, 1). This vesiculation is not perceptible in the hyphae fixed in glutaraldehyde in phosphate buffer (pl. II, 1). Pl. III, 2, shows the ultrastructural changes that occur apart from high vacuolization. In the vacuoles, dense bodies are seen whose origin and structure are unknown. There is a possibility that in the mycobiont these may also correspond to lipid deposits. They do not have myelinic shapes like in the phycobiont, possibly due to the fact that in the phycobiont they may largely come from the fine thylakoid laminas, while this cannot be the case in the mycobiont which does not have such membranes.

Apart from the vacuoles and the dense deposits inside, a change in the cytoplasmic cytogel is observed, as well as in the nucleus, and even in the reserve bodies that are typical for these lichenized hyphae.

In the mycobiont of *L. pulmonaria* (pl. III, 3), there are also ultrastructural changes due to the effect of this fixation. They are of a very different nature and basically consist of the presence of dense points which sometimes reach the size of small globules in the cytoplasm.

From these observations on the mycobiont of *L. amplissima* and *L. pulmonaria* it can be concluded that although the glutaraldehyde fixation in water may be adequate for the *Myrmecia* phycobiont, it is not appropriate for the mycobiont of both thalli. The mycobionts of the two species react differently to the fixing solution.

ACKNOWLEDGEMENTS. – We wish to thank Teresa CARNOTA & Fernando PINTO for their technical assistance. The study was financed by the «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno» (the Government Advisory Commission for Scientific and Technical Research) as Project nº 169/85.

REFERENCES

ASCASO C., BROWN D.H. and RAPSCH S., 1985 – Ultrastructural Studies of Desiccated Lichens. *In* : D.H. BROWN, *Lichen Physiology and Cell Biology*. New York and London: Plenum Press. Pp. 259-274.

ASCASO C., BROWN D.H. and RAPSCH S., 1986 – The Ultrastructure of the phycobiont of desiccated and hydrated lichens. *Lichenologist* 18 : 37-46.

COETZEE J. and VAN DER MERWE C.F., 1984 – Extraction of substances during glutaraldehyde fixation of plant cells. *J. Microscopy* 135 : 147-158.

GOODCHILD D.J. and CRAIG S., 1982 – Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons. IV. Effects of preparative procedures on ultrastructural integrity. *Austral. J. Pl. Physiol.* 9 : 689-704.

HOLOPAINEN T.H., 1981 – Alterations in the Ultrastructure of epiphytic lichens *Hypogymnia physodes* and *Alectoria capillaris* caused by air pollution. *Silva Fennica* 15 : 469-474.

HOLOPAINEN T.H., 1982 – Summer versus winter condition of the ultrastructure of the epiphytic lichens *Bryoria capillaris* and *Hypogymnia physodes* in central Finland. *Ann. Bot. Fenn.* 19 : 39-52.

IQBAL S.J. and WEAKLEY B.S., 1974 – The effects of different preparative procedures on the ultrastructure of the hamster ovary. I. Effects of various fixative solutions on ovarian oocytes and their granulosa cells. *Histochemistry* 38 : 95-122.

REYNOLDS E.S., 1963 – The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17 : 208-212.

SPURR A.R., 1969 – A low epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26 : 31-43.

EFFECTS OF TWO FUNGICIDES AND THREE ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE UREDOSPORE GERMINATION OF *PUCCINIA ARACHIDIS* SPEG.

by V.A. ADISA and J.B. OLA*

ABSTRACT. – The process of germination of uredospores of *Puccinia arachidis* causing the rust of groundnut, *Arachis hypogaea*, was studied on glass slide, malt extract agar and host epidermal strip. The effects of spore concentration, light, temperature and relative humidity on spore germination of the fungus were also investigated. The emergence of germ tube occurred after 9 hrs, 12 hrs and 21 hrs on malt agar, host epidermis and glass slide respectively, while maximum germination was recorded after 18 hrs, 25 hrs and 35 hrs on the three substrates in the same order. Germination was highest on malt agar and least on glass slide. Optimum spore germination occurred on malt agar at 25°C, 89 % relative humidity, 600 Lux and spore concentration of 1.10^4 spores/ml. Benlate gave a better inhibitory effect than brestan when tried against the spore germination.

RÉSUMÉ. – Étude du processus de germination des urédospores de *Puccinia arachidis*, provoquant la rouille des arachides : *Arachidis hypogaea*, sur lame de verre, sur milieu malt-agar et sur épiderme de l'hôte. Les effets de la concentration des spores, de la lumière, de la température et de l'humidité relative sur la germination des spores ont également été étudiés. Le tube germinatif apparaît après 9 h sur milieu malt-agar, 12 h sur épiderme de l'hôte et 21 h sur lame de verre; la germination maximale est enregistrée après 18 h, 25 h et 35 h respectivement sur les trois substrats pris dans le même ordre. La germination des spores est optimale sur milieu malt-agar à 25°C, 89 % d'humidité relative, 600 Lux et avec une concentration de 1.10^4 spores/ml. L'effet inhibiteur du Benlate contre la germination des spores est supérieur à celui du brestan.

KEY WORDS : Uredospore germination, *Puccinia arachidis*, fungicides.

INTRODUCTION

Puccinia arachidis Speg. is the causal organism of the rust of groundnut, *Arachis hypogaea* L. A review of literature shows that uredospores of rust fungi germinate less rapidly and less completely if they are removed from the

* Department of Botany and Microbiology, University of Ibadan, Ibadan, Nigeria.

sorus of uredium before being separated from their parent cells. COCHRANE (1960) pointed out that the overall rapidity of germination is a species characteristic: *Melampsora lini* (Pers.) Lev. begins germination in less than one hour but *Phoma apiicola* Klebahn spore requires 24-48 hours.

The effect of temperature on the germination of uredospores of *Puccinia* spp. indicates a wide range : *P. sorghi* Schw., 2-35°C (SHAW, 1964); *P. cynodontis*, 1.5-35°C (VARGAS & al., 1967). SUSSMAN & DONTHIT (1973) however, reported that low temperature depressed the germination of uredospores of *P. graminis* Pers. and those in cold dormancy germinated at 40°C when activated. the major effect of temperature is assumed to be on enzymatic process.

Day length and light intensity had little effect on the germination of *P. helianthi* Schw. but higher light intensity had an adverse effect on the germination of spores stored for two months at – 16°C (SOOD & SACKSTON, 1971, 1972). According to MADDISON & MANNERS (1973), nucleic acids and proteins of spores are affected by high light intensity.

The uredospore is the spreading phase of *Puccinia arachidis* which it actively produces on *Arachis hypogaea* throughout the growing season. Certain environmental factors therefore favour the existence of this stage of its life cycle. The control of this plant pathogen at this stage by protectant fungicides is in the problem of inhibiting the uredospore germination. The effects of two fungicides and some environmental factors on the process of uredospore germination of *P. arachidis* is being reported.

MATERIAL AND METHODS

The infected leaflets of *Arachis hypogaea* were collected from the Botanical nursery, Department of Botany and Microbiology, University of Ibadan, Nigeria. The preparation of the spore suspension was done by scraping uredospores from pustules on infected leaflets into 5 ml sterile distilled water. The suspension was then filtered through muslin cloth and the desired concentration was estimated using a Hawksley Cristallite B.S. 748 haemocytometer as described by PURVIS & al. (1966). A preliminary investigation on the effect of spore load on germination showed that 1.10^4 spores/ml was the concentration of spores that gave the most satisfactory results. Therefore except otherwise stated, this inoculum load was used throughout the study.

The experiments on spore germination on glass slide, 2 % malt extract agar and host epidermal strip were carried out. A drop of the spore load was placed on glass slide to form a film while another spore load was placed on each of four zones of Petri dish when two lines meeting at right angles were drawn at the bottom of plate. A teased epidermal strip from healthy host leaf was obtained, placed on a glass slide and a drop of spore load was inoculated on the strip. Each preparation was placed in a desiccator with about 90 % relative humidity at 28.5°C.

Variations in temperature were obtained in incubators set between 5-40°C, at 5°C interval, while the levels of relative humidity were obtained by using the method of WINSTON & BATES (1960). Solid phosphorus pentoxide and sterile distilled water gave 0 % and 100 % respectively. Four variations of light regimes were obtained : continuous darkness; continuous light; alternating light / darkness and alternating darkness / light. For the alternating periods of light and darkness, inoculated cultures were maintained 9 hours in continuous light and 9 hours in continuous darkness. For continuous darkness, Petri dishes containing the spores were wrapped with aluminium foil and kept in dark boxes. Light intensity was obtained by variations in degree of illumination with fluorescent bulbs and intensity produced was measured with a LI-COR photometer and expressed in Lux.

Water suspensions or solutions of brestan (fentin acetate or triphenyltin acetate, $C_{20}H_{18}O_2S$) and benlate (methyl-1-butyl carbamoyl-2 benzimidazole-carbamate) at 10, 50, 100, 250, 500 and 1000 ppm of active ingredients (DHANVANTARI, 1968) were prepared. One millilitre of the fungicide suspension/solution or sterile water (as control) was sprayed with a syringe on solidified surface of malt agar in Petri dishes, spread and allowed to stand for 4 hrs. One drop of spore suspension was then added to each of the four zones on medium, incubated at 28.5°C for 18 hrs. The spore germination was stopped at the required time with formalin acetic alcohol (5 : 5 : 90 v/v).

RESULTS

The uredospore measured between 15.7 - 22.9 µm at zero hour and between 20.0 - 30.0 µm prior before the emergence of germ tube. The process of uredospore germination showed the following : on the glass slide, emergence of germ tube occurred after 21 hrs of incubation and formation of hyphae occurred after 27 hrs; on malt agar, germ tube emergence was observed after 9 hrs while formation of hyphae occurred after 15 hrs; on host epidermal strip, after 12 hrs and 25 hrs of incubation, germ tube and hyphae were produced respectively. Maximum percentage germination of uredospores of 26 % at 35 hrs, 48 % at 18 hrs and 32.6 % at 25 hrs was recorded on glass slide, malt agar and epidermis respectively (Fig. 1).

The results obtained on the effect of spore concentration on germination showed that no germination was observed either at 100.10^4 spores/ml or 1000.10^4 spores/ml. The results further showed that poor appreciable germination were recorded at 10.10^4 spores/ml and at 1.10^4 spores/ml respectively (Table 1).

The results of the effect of temperature on germination revealed that good germination was recorded between 20-30°C, optimum at 25°C (Fig. 2) while germination was poor at 5°C and 35°C with no germination at 40°C.

Table 1 – Effect of spore concentration on the germination of uredospores of *Puccinia arachidis* on 2 % malt agar after 18 hrs of incubation at 28.5°C.

Tableau 1 Effet de la concentration des spores sur la germination des urédospores de *Puccinia arachidis* sur malt-agar 2 % après 18 hrs d'incubation à 28.5°C.

spore concentration (spores/ml)	total number of spores estimated	% mean germination
1.10^4	479.0	43.8 ± 1.8*
10.10^4	480.0	5.0 ± 0.1
100.10^4	478.0	0
1000.10^4	481.0	0

* standard error

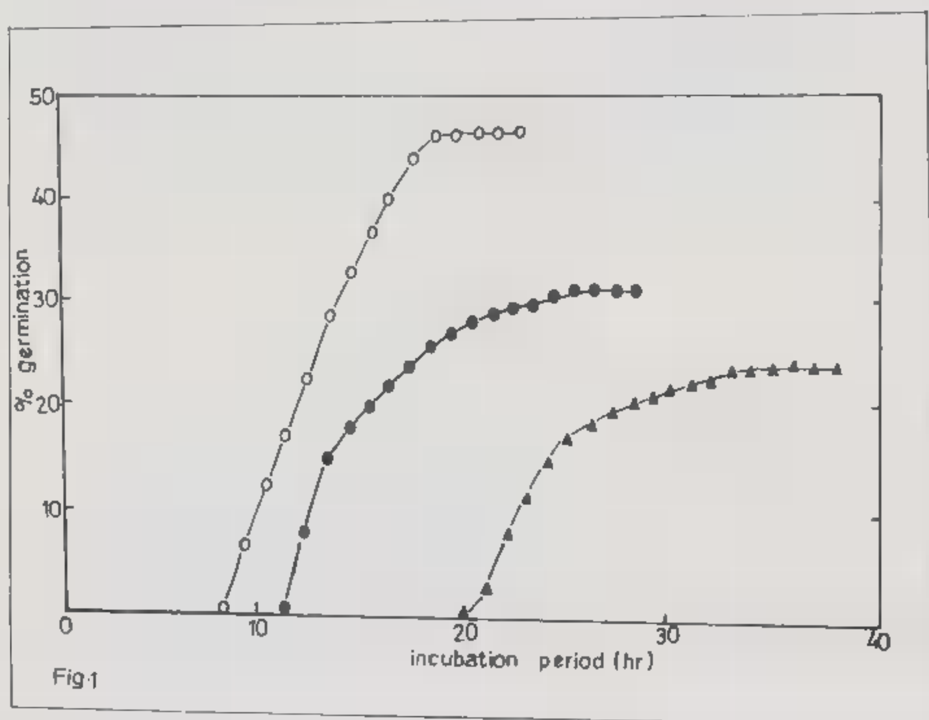


Figure 1 – Percentage germination of uredospores of *Puccinia arachidis* on three substrata : glass slide ▲–▲; host epidermal strip ●–●; malt agar ○–○; incubated for varying periods of time (hours) at 28.5°C under about 90 % relative humidity. Results are means of three replicates.

Figure 1 – Pourcentage de germination des urédospores de *Puccinia arachidis* sur les trois substrats : lame de verre ▲–▲; épiderme d'hôte ■–●; malt-agar ○–○; selon le temps d'incubation (heures) à 28.5°C et 90 % d'humidité relative environ. Les résultats sont les moyennes de trois expérimentations.

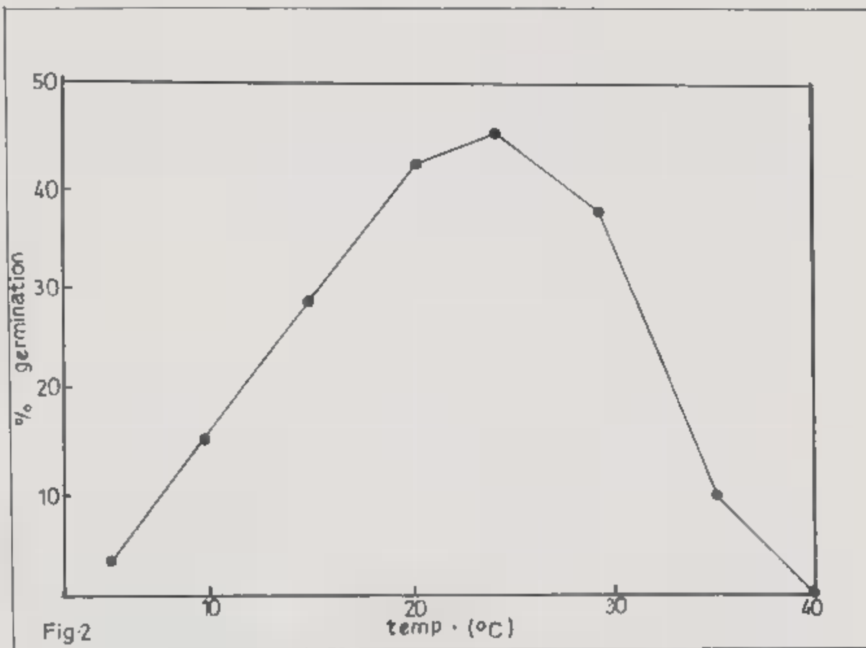


Figure 2 – Effect of temperature on the germination of uredospores of *Puccinia arachidis* on malt agar during 18 hrs of incubation. Results are means of three replicates.

Figure 2 – Effet de la température sur la germination des urédospores de *Puccinia arachidis* sur malt-agar pendant 18 heures d'incubation. Les résultats sont les moyennes de trois expérimentations.

The results of the effect of relative humidity levels on germination showed that no germination was recorded at 0 % while poor germination occurred at 32.5 % (Fig. 3). More uredospores germinated on malt agar than on glass slide, though each having optimum germination at 89 % level.

Table 2 – Effect of 4 light regimes on the germination of uredospores of *Puccinia arachidis* during 18 hrs of incubation at 28.5°C.

Tableau 2 – Effet de 4 régimes de lumière sur la germination des urédospores de *Puccinia arachidis* pendant 18 hrs d'incubation à 28.5°C.

light regimes	total number of spores estimated	% mean germination
continuous light	684.0	41.4 ± 2.3*
continuous darkness	664.0	47.4 ± 1.6
darkness/light (9 hrs each)	680.0	7.1 ± 0.3
light/darkness (9 hrs each)	660.0	10.1 ± 0.3

* standard error.

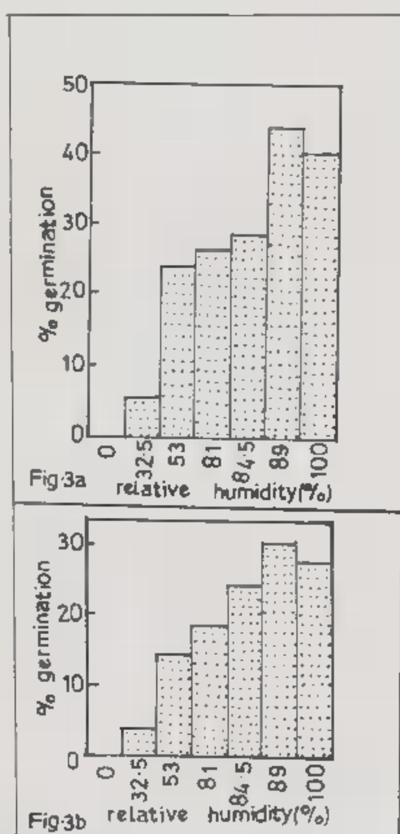


Figure 3 – Effect of relative humidity on the germination of uredospores of *Puccinia arachidis* on malt agar in 18 hrs (a) and on glass slide in 3 hrs (b) at 28.5°C. Results are means of three replicates.

Figure 3 – Effet de l'humidité relative sur la germination des urédospores de *Puccinia arachidis* sur malt-agar en 18 hrs (a) et sur lame de verre en 3 heures (b) à 28.5°C. Les résultats sont les moyennes de trois expérimentations.

Table 3 – Effect of brestan and benlate on the germination of uredospores of *Puccinia arachidis* after 18 hrs of incubation at 28.5°C.

Tableau 3 – Effet du brestan et du benlate sur la germination des urédospores de *Puccinia arachidis* après 18 heures d'incubation à 28.5°C.

fungicide conc. (ppm)	% mean germination recorded for each fungicide	
	brestan	benlate
0	29.2 ± 1.8*	25.8 ± 0.5
10	20.8 ± 1.6	9.5 ± 0.2
50	16.3 ± 1.1	5.0 ± 0.1
100	15.0 ± 1.0	2.5 ± 0.1
250	12.5 ± 0.7	0
500	5.7 ± 0.2	0
1000	1.0 ± 0.02	0

* standard error.

The results of the experiments on the effect of light regimes showed that poor germination was recorded when uredospores were exposed to alternating light and darkness and vice versa while good germination occurred when spores were under continuous exposure to either light or darkness (Table 2). As for the effect of light intensity on spore germination, no germination occurred at 2000 Lux while poor germination was recorded at 80 Lux and 1800 Lux. However, good germination was recorded at 140 Lux and 1500 Lux with the optimum at 600 Lux (Fig. 4).

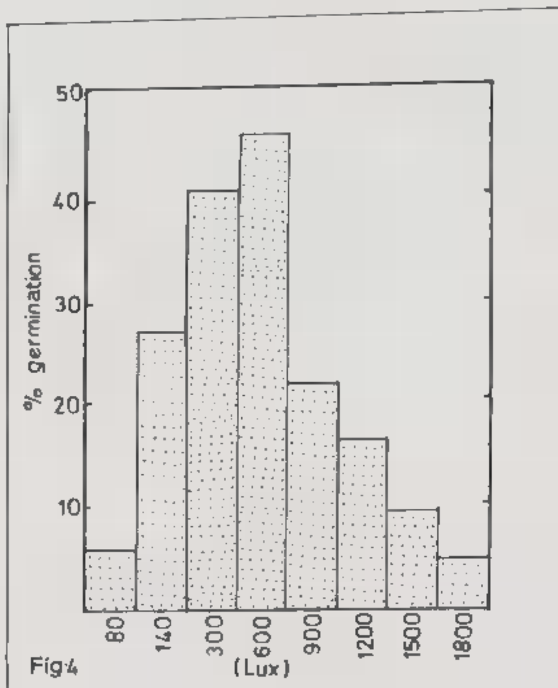


Figure 4 – Effect of light intensity on the germination of uredospores of *Puccinia arachidis* on malt agar in 18 hrs of incubation.

Figure 4 – Effet de l'intensité de la lumière sur la germination des urédospores de *Puccinia arachidis* sur malt-agar en 18 heures d'incubation.

The effect of the two fungicides on spore germination recorded 12.5 %, 5.7 % and 1.0 % at 250 ppm, 500 ppm and 1000 ppm respectively of brestan. With benlate, no germination was recorded at any of these three concentrations (Table 3).

DISCUSSION

Spores of lower moisture content absorb water to about 70 % before germination occurs (COCHRANE, 1958) and the frequent swelling of spores in water may be due to this dryness. The observations made on the swelling of uredospore prior to the emergence of germ tube indicated that the uredospores had absorbed water to certain considerable level and this may mean that uredospores of *P. arachidis* contained lower moisture.

The commencement of germination was fast on malt agar and epidermal strip (after 9 hrs and 12 hrs respectively) while it was delayed on glass slide (at 21 hrs). The findings of SHAW (1964), COCHRANE (1958) and SUSSMAN & DONTHIT (1973) showed that germination of spores takes longer period on non-absorptive medium like glass and that period of time is reduced by using solid substrate like agar which itself absorbs water from the atmosphere. The presence of nutrients in the medium and exudates on epidermal strip might possibly have stimulated the germination of the spores on these substrates. Such stimulating substances are absent on glass slide. However, the maximum germination (less than 50 %) recorded on each substrate was low. According to COCHRANE (1960), such an observation may be due to the immaturity of some of the uredospores.

There was no germination recorded at spore load of 100.10^4 and 1000.10^4 spores/ml. This may be due to self inhibition as a result of production of inhibitory substances (BROWN & HARVEY, 1927; GOTLIEB, 1950; ALLEN, 1955). On the other hand, that there was no germination at the two highest spore loads could also be due to competition for nutrients by these spores from their micro-environment. Germinating uredospores of *P. graminis* released volatile substances which inhibited germ tube elongation (ALLEN, 1955) while FORSYTH (1955) reported that uredospores of *P. graminis tritici* Erikss & Henn. produced a trimethylene compound (2 - methyl - butene - 2) which inhibited spore germination.

The uredospores germinated over a wide temperature range of 5-35°C with the optimum at 25°C. This range is similar to that obtained for *P. sorghi* by EVERSMERGER & BERLEIGH (1968). These observations may mean that inactivation of uredospores would occur at very cold and very high temperatures. The optimum percentage germination of the uredospores of *P. arachidis* occurred at 89 % relative humidity. This shows that this relative humidity would encourage more infections on the host. The following prevailing weather conditions : temperature of 26°-30°C; relative humidity of about 85 %; light intensity 347.2 Lux were recorded in the fields of the wetter South Western Nigeria where the disease was recorded. Furthermore, the fact that no germination was recorded at 0 % relative humidity and poor germination at 32.5 % relative humidity may be interpreted to mean that dry conditions would not favour the germination of the spores.

It is difficult to explain the poor germination of the uredospores as recorded in the alternating regimes of light even though alternating light and darkness

is the normal light regime in nature where the spore of the pathogen is exposed to. However, the ability of the uredospores to germinate on exposure to either light or darkness supported the earlier findings that light has no significant effect on germination as on sporulation (COCHRANE, 1960; DARBY & MANDELS, 1955). The results obtained on the effect of light intensity on germination was similar to that obtained for temperature. This observation could be due to the method used in obtaining variations in light intensity. Previous reports on light intensity on germination experiments tend to express the effect of illumination rather than degree of intensity. Variations of temperature occur with increase in light intensity.

Fungicidal action is a linear function of amount of toxicant taken up by spores. Brestan is highly toxic and fungicidal to about the same range of fungi as the copper fungicides but at about one-tenth the dosage (SPENCER, 1973). The mode of action of brestan is not widely reported however, we do speculate that it might act on the DNA or disrupt protein synthesis in the spores during germination. Benlate, a systemic fungicide, also shows from the literature that not much is known on its mode of action. Little is known about the ways in which systemic fungicides destroy or inactivate fungi (TARR, 1972). Because of the high toxicity of brestan and also because of the fact that benlate gave a better inhibitory effect on the germination of uredospores, benlate is therefore being recommended for field trials. These results obtained during this study would therefore facilitate a possible and effective control disease management technique on this spreading phase, the uredospore, of the pathogen. *P. arachidis* actively grows on the groundnut leaflets throughout the growing season.

REFERENCES

ALLEN P.J., 1955 - The role of a self inhibitor in the germination of rust uredospores. *Phytopathology* 45 : 259-266.

BROWN W. and HARVEY C.C., 1927 – Studies in the physiology of parasitism. X. On the entrance of parasitic fungi into the host plant. *Ann. Bot. (London)* 41 : 643-662.

COCHRANE V.W., 1958 – *Physiology of fungi.* New York, John Wiley & Sons.

COCHRANE V.W., 1960 – Spore germination. *In* : J.G. HORSFALL & A.E. DIMOND, *Plant Pathology. An Advanced Treatise*, vol. II. New York, Academic Press : 169-202.

DARBY R.T. and MANDELS G.R., 1955 – Effect of sporulation, medium and age on fungus spore physiology. *Pl. Physiol. (Lancaster)* 30 : 360-366.

DHANVANTARI B.H., 1968 – Effects of selected fungicides on germination of conidia of *Cytospora cincta* and *C. leucosoma* in vitro. *Canad. J. Pl. Sci.* 48 : 401-404.

EVERSMEYER M.G. and BURLEIGH J.R., 1968 - Effect of temperature on the longevity of *P. recondita* f. sp. *triti* uredospores on dry wheat foliage. *Pl. Dis. Reporter* 52 : 168-188.

FORSYTH F.R., 1955 - The nature of the inhibiting substances emitted by germinating uredospores of *P. graminis* var. *tritici. Canad. J. Bot.* 33 : 383-390.

GOTLIEB D., 1950 – The physiology of spore germination in the fungi. *Bot. Rev.* 16 : 229-257.

MADDISON A.C. and MANNERS J.G., 1973 – Lethal effects of artificial U.V. radiation on cereal rust uredospores. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 60 : 471-498.

PURVIS M.J., COLLIER D.C. and WALLS D., 1966 – Laboratory techniques in botany. London, Butterworths.

SHAW M., 1964 – The physiology of rust uredospores. *Phytopathol. Z.* 50 : 159-180.

SOOD P.N. and SACKSTON W.E., 1971 – Studies on sunflower rust. VII. Effect of light and temperature during spore formation on the germinability of fresh and stored uredospores of *P. helianthi*. *Canad. J. Bot.* 49 : 21-25.

SOOD P.N. and SACKSTON W.E., 1972 – Studies on sunflower rust. XI. Effect of light and temperature on germination and infection of sunflowers by *P. helianthi*. *Canad. J. Bot.* 50 : 1879-1886.

SPENCER E.Y., 1973 – *Guide to the chemicals used in crop protection.* Research Inst. University of Western Ontario. Ontario, Canada. Publication 1093 (5th edition).

SUSSMAN A.S. and DONTHIT H.A., 1973 – Dormancy in microbial spores. *Annual Rev. Pl. Pathol.* 24 : 311-352.

TARR S.A.J., 1972 – *Principles of Plant Pathology.* London, The Macmillan Press.

VARGAS J.M., YOUNG H.C. Jr. and SAARI E.E., 1967 – Effect of light and temperature on uredospore germination, infection and disease development of *P. cynodontis* and isolation of pathogenic races. *Phytopathology* 57 : 405-409.

WINSTON P.W. and BATES D.H., 1960 – Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41 : 232-237.

Cryptogamie, Mycol. 1987, 8 (1) : 33-42

HISTOCHEMISTRY OF CYTOPLASMIC RESERVES IN EXCIPULAR HYPHAE OF *CATILLARIA BOUTEILLEI* (DESM.) ZAHLBR.

by P. MODENESI and L. LAJOLO*

SUMMARY. – Histochemical aspects of cytoplasmic reserves in excipular hyphae during the development of apothecia in *Catillaria bouteillei* were studied by conventional, fluorescence and scanning electron microscopy. Positive tests were obtained for polysaccharides, proteins, polyphosphates, lipids and acid phosphatase activity. Our results show that the excipular border can be distinguished in two separate parts of differing histochemical reactivity. While the lateral and basal portions are an important site for the accumulation of reserve substances, active meroholocrine secretion takes place in the upper portion. The extrusion process allows the appearance in the adult apothecia of a thin, intensely acidic layer of mucilage, above the hymenium.

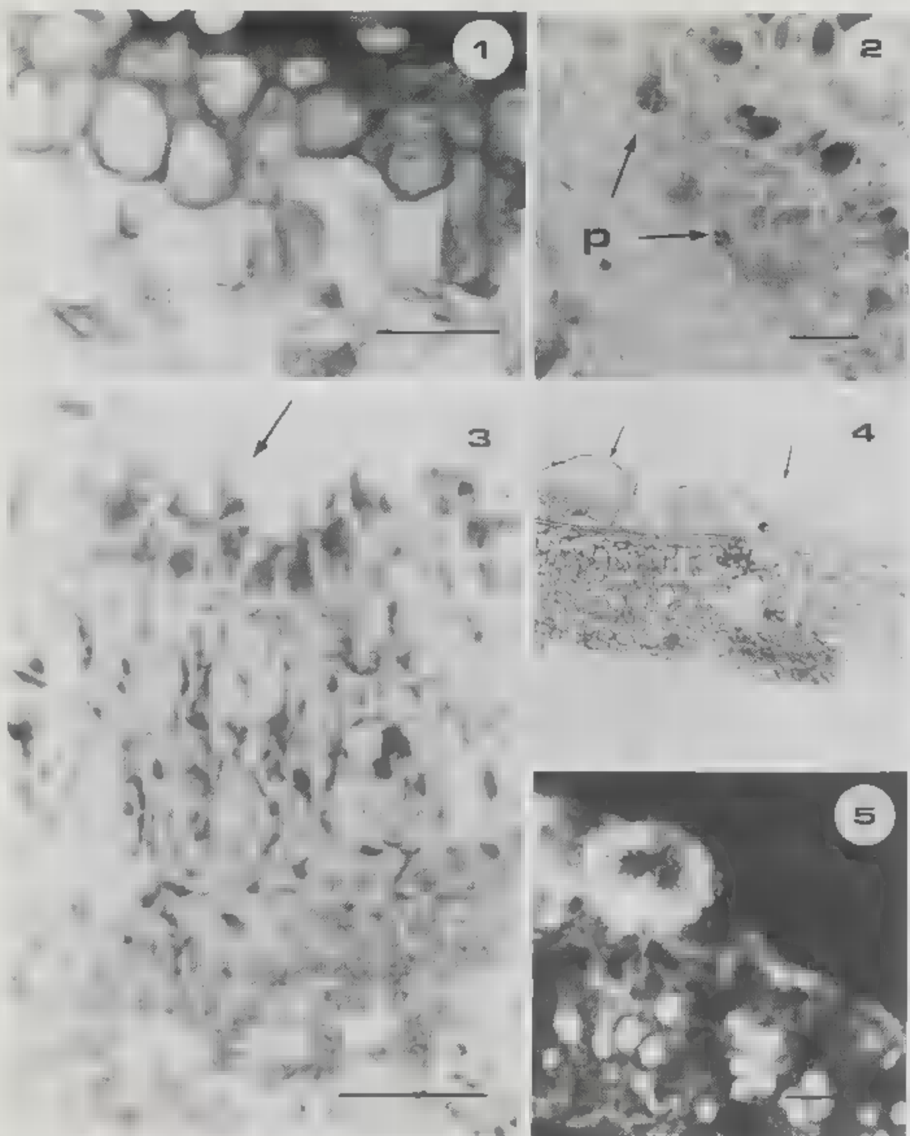
RÉSUMÉ. – Les aspects histochimiques des réserves cytoplasmiques des hyphes excipulaires pendant le développement des apothécies chez *Catillaria bouteillei* sont étudiés par microscopie photonique traditionnelle, à fluorescence et électronique à balayage. Les tests sont positifs pour les polysaccharides, les protéines, les polyphosphates, les lipides et l'activité phosphatase acide. Nos résultats montrent que la marge excipulaire est constituée de deux parties ayant des réactions histochimiques différentes. Tandis que les parties latérales et basales constituent un site important d'accumulation de substances de réserve, la partie supérieure présente une sécrétion de méroholocrine active. Le processus d'extrusion dans l'apothécie adulte conduit à l'apparition d'une fine couche de mucilage très acide au-dessus de l'hyménium.

KEY WORDS : *Catillaria bouteillei*, lichenized fungi, histochemistry.

INTRODUCTION

Catillaria bouteillei (Desm.) Zahlbr., a foliicolous lichen, was the subject of our recent study concerning some histochemical aspects of the hypothalline hyphae (MODENESI & al., 1986). Our results have allowed the correlation of the presence of mucilage on the lower edge of the thallus with the particular ecology of the lichen. During this study it was observed that the remarkable

* Istituto Botanico «Hanbury», Corso Dogali 1/C, 16136 Genova - Italia.



Figures 1 to 5 — 1 : Section of basal excipular hyphae, of an apothecium in phase 1, showing extensive deposits of polysaccharides and punctuated unstained areas. PAS reagents. Scale bar 10 μm. 2 : Section of basal excipular hyphae of an apothecium in phase 2 stained with TBO pH 4.4. Polyphosphates granules (p) of varying size are visible as metachromatic (arrows). Scale bar 10 μm. 3 : Section of apothecium (central part) in phase 1 stained with Amido black. Round protein-containing structures in the basal portion of excipulum are common. In the upper portion the staining reaction is most extensive. Note the lysis of some upper excipular cells (arrow). Scale bar 20 μm. 4 : Transversal section of the lichen-carrying leaf showing in the upper edge of sectioned apothecia (phase 2) a thin metachromatic layer (arrows) of sulphated polysaccharides. TBO pH 1. Scale bar 100 μm. 5 : Transversal section of the lichen thallus carrying an apothecium in phase 1. The excipulum intensely fluoresces silvery-white with phosphine. Scale bar 10 μm.

histochemical reactivity of the cytoplasm of the excipular hyphae, the tissue surrounding the thecium and evident as the proper margin, varied during the transition from the youthful phase to the adult phase in the apothecia.

To understand better the changes which may occur at a cellular level, a histochemical study of apothecia as they developed must be undertaken. In this respect such methods have provided a valuable tool in the study of some fungi (MOTTA, 1969; KOSAHIH & WILLETS, 1975; MOORE-LANDECKER, 1981). On the other hand histochemical observations in the lichenized-fungi are not extensive. Our study carried out by conventional, fluorescence and electron scanning microscopy, concerns histochemical aspects of excipular hyphae contents during the final development of apothecia in *Catillaria bouteillei*.

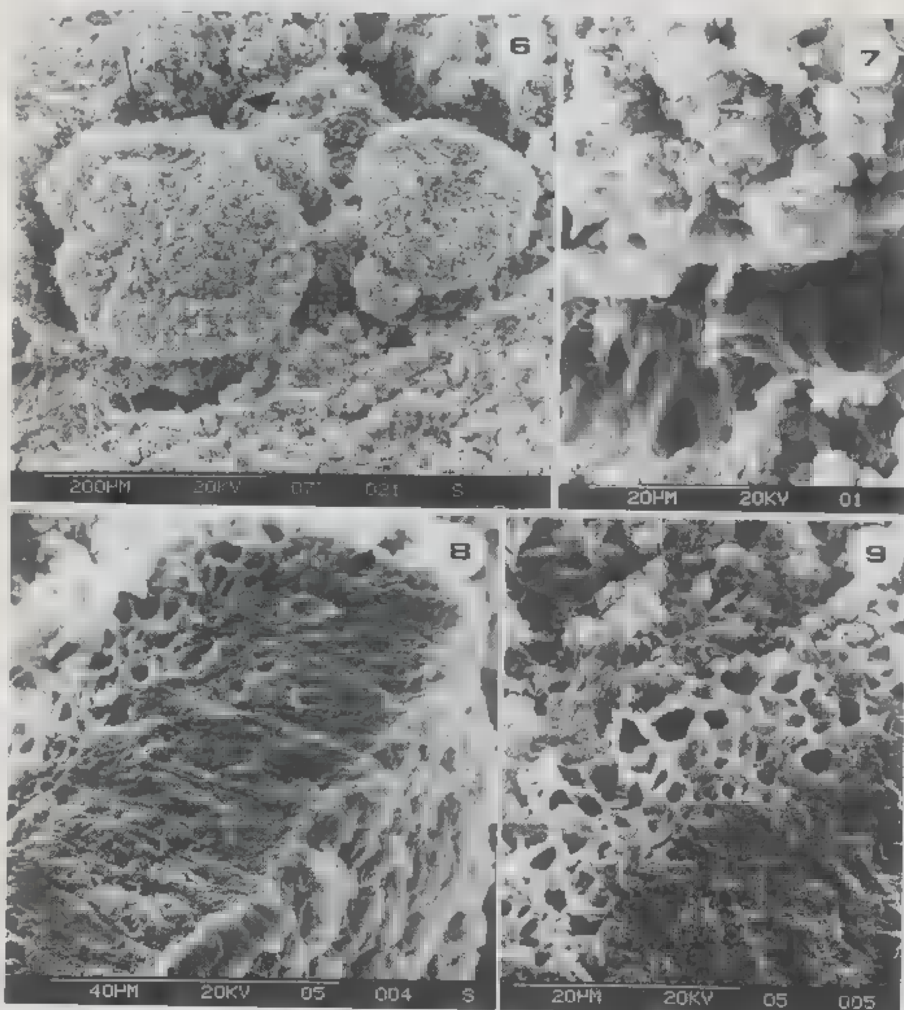
MATERIAL AND METHODS

Thalli of *Catillaria bouteillei* growing on leaves of *Buxus sempervirens* were collected in eastern Liguria.

Light microscopy : small pieces of leaf-carrying lichen or isolated apothecia were fixed either in FAA (Formalin-Acetic acid-ethyl Alcohol) (SASS, 1958) for 24 hours or in glutaraldehyde 3 % in 0.1 M phosphate buffer at pH 6.8 for 4 hours at 0-4°C. Following dehydration in an ethanol series, samples were embedded either in JB4 resin (Polyscience Inc.) or in methyl-butyl methacrylate mixture (FEDER & O'BRIEN, 1968) in embedding polyethylene (Polyscience Inc.) capsules. For the histochemical demonstration of acid phosphatase, specimens were fixed and embedded in JB4 at cold temperature according to NAMBA & al. (1983).

Sections 2.5 µm thick were cut with a glass knife on a Reichert OM2 microtome. For histochemical investigations, embedded sections or sections obtained by a cryostat microtome were processed with the following methods : a) Periodic acid-Schiff reagent (PAS) for polysaccharides (PEARSE, 1985); b) Carmine Best's method (PEARSE, 1985) and Iodine-Potassium iodide reaction (IKI) (JENSEN, 1962) for glycogen; c) Toluidine Blue 0 (TBO) at pH 4.4 and pH 1

Figures 1 à 5 – 1 : Coupe d'hyphes excipulaires basales d'une apothécie en phase 1, montrant des dépôts importants de polysaccharides et des zones ponctuelles non colorées. Réaction PAS. Échelle : 10 µm. 2 : Coupe d'hyphes excipulaires basales d'une apothécie en phase 2, colorée avec le TBO pH 4,4. Les granules de polyphosphates (p) de tailles variables sont métachromatiques (flèches). Échelle : 10 µm. 3 : Coupe d'apothécie (partie centrale) en phase 1, colorée à l'amido black. Les structures rondes contenant des protéines sont fréquentes dans la partie basale de l'excipulum. Dans la partie supérieure, la réaction de coloration est plus forte. Noter la lyse de quelques cellules excipulaires supérieures (flèche). Échelle : 20 µm. 4 : Coupe transversale de la feuille portant le lichen, montrant sur le bord supérieur de l'apothécie sectionnée (phase 2) une couche fine métachromatique (flèches) de polysaccharides sulfatés. TBO pH 1. Échelle : 100 µm. 5 : Coupe transversale du thalle lichénique portant une apothécie en phase 1. L'excipulum montre une intense fluorescence blanc-argenté avec la phosphine. Échelle : 10 µm.



Figures 6 to 9 – SEM micrographs. 6 : Upper view of the thallus with apothecia at various stages of development. In the adult one (arrow) the excipulum is not found on the upper side; in the youngest ones it occurs as a complete border (head arrow). 7 : Lateral view of an adult apothecium showing the excipular edge. Here the cells have a spongy aspect due to the lytic processes. 8 : Transversal view of an adult apothecium. The excipulum only basally occurs. 9 : Transversal view of the basal excipular cells.

Figures 6 à 9 – Microscopie électronique à balayage. 6 : Vue «aérienne» du thalle avec des apothécies à différents stades de développement. Sur les apothécies adultes (flèche), l'excipulum ne se trouve pas sur la partie supérieure; sur les plus jeunes, il forme une marge complète (tête de flèche). 7 : Vue générale d'une apothécie adulte montrant la marge excipulaire. Les cellules ont ici un aspect spongieux, dû aux procédés lytiques. 8 : Vue transversale d'une apothécie adulte. L'excipulum apparaît seulement à la base. 9 : Vue transversale des cellules excipulaires basales.

for polyanions (LING LEE & al., 1977); d) Alcian Blue 8GX (AB) at pH 0.5 for acid sulphated polysaccharides (LEV & SPICER, 1964); e) Histochemical experiments with critical electrolyte concentration (CEC) for blocking alcianophilia at graded concentrations of $MgCl_2$ to show the various charged groups of carbohydrates (PEARSE, 1985); f) Amino Black 10 B for proteins (FISHER, 1968); g) Sudan Black B and Phosphine 3R for lipids (PEARSE, 1985); h) BURSTONE's method for acid phosphatase (NAMBA & al., 1983). The following extraction and enzymatic digestion procedures were carried out on sections : a) Trichloroacetic acid (TCA) prior to staining with TBO at pH 1 to remove polyphosphate (ASHFORD & al., 1975); b) Papain, prior to staining with Amido Black to remove protein (PEARSE, 1985); c) α-amylase from *Bacillus subtilis* or human saliva (BULLOCK & al., 1980) prior to staining with PAS reagent to remove glycogen.

For all the above histochemical methods, control reactions were carried out following the suggestions of the respective authors. For fluorescence microscopy, after staining, sections were mounted in an UV-inert medium (Serva Inc.) and observed with a Leitz microscope fitted with an epi-illuminator, UV exciting illumination and Fluotar objectives.

Scanning electron microscopy : samples were prepared as described elsewhere (MODENESI & al., 1986). To obtain transverse section views of apothecia, isolated apothecia were frozen by immersion in liquid nitrogen and fractured with a razor blade. Specimens were then air dried, directly coated in the Sputtering and observed with a Stereoscan Cambridge 250 MK2.

RESULTS

Lecideoids apothecia of *Catillaria bouteillei* show a whitish paraplectenchymatous border called excipulum (SANTESSON, 1952) of 10-30 µm in thickness. It is made up of sub-roundish cells in section of 4-8 µm in width (Figs. 1, 9).

During the phases of development of the apothecia observed, the excipulum shows itself in two different configurations : a) it forms a complete border around the fertile part, covering it on all sides (phase 1 or youthful phase) (Figs. 3, 5, 6); b) it is absent on the upper side because of the growth of the underlying fertile portion, and in part because of the lysis of the upper excipular cells (Fig. 3, 7). In this way the excipulum only remains in the lateral and basal portions (phase 2 or adult) (Figs. 4, 6, 8).

Our histochemical observations, summarized in Table 1, refer to the content of excipular hyphae in these two different stages of the development of the apothecia.

Carbohydrates : the PAS reaction, which indicates the presence of polysaccharides with 1:2 glycol groups, stained red the cytoplasm of the excipular cells. This took on a characteristic punctuated aspect, due to the presence of minute and numerous unstained areas of a non-polysaccharide nature (Fig. 1). The Best

Stain	Substances	Observed reaction					
		Phase 1			Phase 2		
		B	L	U	B	L	Us
PAS	Polysaccharides	++	++	++	+	+	+
Best's/IKI	Glycogen	+	–	–	–	–	0
TBO pH 4.4	Polyanions	++	++	++	+	–	++
TCA-TBO pH 1	Polysulphates	0	0	++	0	0	++
AB pH 0.5	Sulphated-polysaccharides	0	0	++	0	0	++
Amido Black	Protein	++	++	+++	+	–	0
Phosphine	Lipids	+++	+++	+++	+	+	0
Sudan Black	Lipids	+++	+++	+++	+	+	0
Burstone	Acid phosphatase	+++	+++	+++	++	+	0

Legend: 0= no appreciable staining, += light staining, ++= moderate staining, +++= heavy staining, –= ambiguous staining. B, L, U= basal, lateral and upper part of excipulum. Us= amorphous layer secreted in upper part of excipulum.

Table 1 – Staining properties of the cytoplasm of the excipular cells in developing apothecia of *Catillaria bouteillei*.

Tableau 1 – Propriétés de coloration du cytoplasme des cellules excipulaires dans les deux phases du développement des apothécies de *Catillaria bouteillei*.

and IKI reactions gave slighter results, only weakly staining the cytoplasm, often with ambiguous results. Analogously the α-amylase or human saliva digestions only managed to remove a small part of the positive PAS matter. These results indicate the presence of a small quantity of glycogen in the cytoplasm which is occupied in greater quantity by other insoluble polysaccharides.

In young apothecia (phase 1) the intensity of the PAS reaction was equally moderate in all parts of the excipulum; in the adult apothecia (phase 2) the reactivity was maintained only in the basal part and in a thin amorphous line above the hymenium.

Polyanions : in phase 1 the cytoplasm showed minute metachromatic granules (bluish red) with TBO at pH 4.4 (Fig. 2). In these conditions several different polyanions (polyphosphates, polysulphates and polycarboxilic acids) carry a negative charge and would give a metachromatic reaction (BULLOCK & al., 1980).

Metachromasy persisted with TBO at pH 1, when the polysulphates and polyphosphates only still proved to be ionized (LING LEE & al., 1977). Staining with TBO at pH 1, preceded by digestion with TCA, which removes polyphos-

phates (ASHFORD & al., 1975), showed that the granules in the cytoplasm of the hyphae of the lateral and basal portions of the excipulum had been completely removed. However this removal did not take place in the upper excipular edge during phase 1. In this latter area the same results was obtained with AB at pH 0.5 which stain the mucopolysaccharide sulphates (Fig. 4). The presence of sulphate acid groups is further substantiated by the persistent alcianophilia with CEC procedure in the presence of 0.5-0.6 M $MgCl_2$.

In phase 2, TBO at pH 4.4 and pH 1, shows the presence of few polyphosphate metachromatic granules only in the basal portion of the excipulum. Both in this case as in the PAS reaction, the upper part of the hymenium shows a thin anamorphous metachromatic line with TBO at low pH, resistant to TCA and positive to AB at pH 0.5.

Protein : at phase 1 the excipular cells show a strong affinity with Amido Black, intensely staining a large number of round structures (Fig. 3). They were about the same size as the unstained areas in PAS stained sections of excipulum (Fig. 1). The removal of such structures brought about by protease preparation confirms that they contained proteins.

The protein storage bodies are clearly delimited in the cytoplasm, only in the basal and lateral portions of the excipular cells. In contrast, in the upper portion they are hardly visible, since also a large part of the cytoplasm reacts intensely with Amino Black and it is sensitive to the protease (Fig. 3). On reaching maturity (phase 2) the basal portion maintains its activity, while it decreases in the lateral portions and disappears in the upper part. This last fact shows that proteins and protein-complexes in histochemically detectable amounts are absent in the thin amorphous line above the hymenium.

Lipids : all parts of excipulum in young apothecia are intensely silvery white fluorescent under ultraviolet light with Phosphine (Fig. 5). Sudan Black also gave a positive reaction confirming a widespread presence of lipidic matter in the cytoplasm of the excipular hyphae.

In phase 2 the tests used show a general and remarkable decrease in affinity to the cytoplasmic content.

Acid phosphatase : tests to demonstrate this enzymatic activity have indicated that during the maturation process in apothecia, the excipular cells were particularly active. At phase 1 the cytoplasm is rapidly and intensely marked. At phase 2 only the basal cells maintain this activity.

DISCUSSION

Our results show that the excipulum in *Catillaria bouteillei* can be distinguished into two separate differentiable parts because of the histochemical reactivity of the cytoplasm constituent cells.

The basal and lateral portions are an important site for storage of reserves. These consist in polysaccharides, among which a small quantity of glycogen, and also proteins, polyphosphates and lipids. In these portions the total quantity of carbohydrates greatly decreases when the apothecia reach maturity. This fact is in keeping with the presence of a considerable acid phosphatase activity. FIGIER (1972) correlates this activity to phenomena of dephosphorilation which suggest an important active intercellular movement of glucids.

The other major cytoplasmic storage reserves are proteins in the form of protein bodies. This is a common feature in fungi where a high protein or protein body content goes together with the phases of the apothecia's development in ectal and medullary excipulum in *Pyronema omphalodes* (MOORE-LANDECKER, 1981) and in the developing sclerotia of *Sclerotinia minor* (BULLOCK & al., 1980). As these authors have noted, this occurrence is not surprising in sclerotia since a large nitrogen requirement would be expected in the initial stage of germination.

Our staining reactions suggest that phosphates are present in the form of polyphosphate. Polyphosphate granules have been previously reported from the fungal component in *Collema leucocarpon* and *Peltigera dolichorrhiza* (CHILVERS & al., 1978). According to HAROLD (1966), usually lower organism store this anion as polyphosphate. This is a thermodynamically high energy compound and its accumulation could be an energy storage mechanism (BULLOCK & al., 1980).

Other cytoplasmic components are lipids which in developing apothecia of *Catillaria bouteillei* are quickly mobilized product. Lipids have been reported as the most common storage product in fungi (HAWKER, 1965; CHET & al., 1977) and they are also reported in oil hyphae in an endolithic *Catillaria* sp. (KUSHNIR & al., 1978).

The upper excipular portion differs histochemically from the preceding ones because of the characteristic presence of sulphated mucopolysaccharides together with the other cytoplasmic reserves (Table 1). This portion is visible as cellularized, only in young apothecia; on reaching maturity they are removed laterally. Furthermore some of the cells are destroyed during growth.

Therefore it seems reasonable to assume that the thin amorphous line visible in adult apothecia is the result of the metabolic activity of the upper excipular cells. In fact it conserves positive reactivity for AB at pH 0.5 as well as the cytoplasmic content of those cells in phase 1 (Table 1). Thus this layer would appear to be derived both from the secreting merochrine processes (where the cells remain intact) and from the holochrine processes (which bring about the lysis of the secreting cells). A high acid phosphatase activity is visible in phase 1. This according to the various authors who consider it to be characteristic of the glandular cells secreting hydrophilic substances in higher (SCHNEPF, 1974; FIGIER, 1972) and lower (HÉBANT & BONNOT, 1974) plants.

In mature apothecia of *Catillaria bouteillei*, this intensely acid, mucilaginous layer is naturally capable of linking water in amounts directly related to the

intensity of the available negative charges (MODENESI & VANZO, 1986). This may therefore have the function of contributing to hymenium hydration, delaying drying and preventing excessive water loss in this foliicolous lichen which lives in strict aerohygrophilic conditions (SANTESSON, 1952; MARGOT, 1977). Another possible function of the mucopolysaccharide layer is a feature related to the covering of the outer surface with mucilage, acting as a first line of defence against colonization by pathogens (MODENESI & al., 1986; MODENESI & VANZO, 1986).

ACKNOWLEDGEMENTS — This study was supported by a grant from the Ministero della Publica Istruzione. We should like to thank Mr. Antonio Corallo of the Photographic Laboratory of the «Hanbury» Institute of Botany.

REFERENCES

ASHFORD A.E., LING LEE M. and CHILVERS G.A., 1975 — Poyphosphate in eucalypt mycorrhizas : a cytochemical demonstration. *New Phytol.* 74 : 447-452.

BULLOCK S., ASHFORD A.E. and WILLETS H.J., 1980 — The structure and histochemistry of Sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger. II. Histochemistry of extracellular substances and cytoplasmic reserves. *Protoplasma* 104 : 333-351.

CHET I., TIMAR D. and HENIS Y., 1977 — Physiological and ultrastructural changes occurring during germination of sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Canad. J. Bot.* 55 : 1137-1142.

CHILVERS G.A., LING LEE M. and ASHFORD A.E., 1978 — Polyphosphate granules in the fungi of two lichens. *New Phytol.* 81 : 571-574.

FEDER N. and O'BRIEN T.P., 1968 — Plant microtechnique : some principles and new methods. *Amer. J. Bot.* 55 : 124-142.

FIGIER J., 1972 — Localisation infrastructurale de la phosphatase acide dans les glandes pétiolaires d'*Impatiens holstii*. Rôles possibles de cette enzyme au cours des processus sécrétoires. *Planta* 108 : 215-226.

FISHER D.B., 1968 — Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16 : 92-96.

HAROLD F.M., 1966 — Inorganic polyphosphates in biology : structure, metabolism and function. *Bacteriol. Rev.* 30 : 772-794.

HAWKER C.E., 1965 — Fine structure of fungi as revealed by electron microscopy. *Biol. Rev.* 40 : 52-92.

HÉBANT C. and BONNOT J., 1974 — Histochemical studies on the mucilage secreting hairs of the apex of the leafy gametophyte in some Polytrichaceous mosses. *Z. Pflanzenphysiol.* 72 : 213-219.

JENSEN W.A., 1962 — Botanical histochemistry. S. Francisco : Freeman.

KOSAHIH B.D. & WILLETS H.J., 1975 — Ontogenic and histochemical studies of the apothecium of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Ann. Bot. (London)* 39 : 185-191.

KUSHNIR E., TIETZ A. and GALUN M., 1978 – «Oil Hyphae» of endolithic lichens and their fatty acid composition. *Protoplasma* 97 : 47-60.

LEV R. and SPICER S.S., 1964 – Specific staining of sulphate groups with Alcian Blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* 12 : 309-329.

LING LEE M., ASHFORD A.E. and CHILVERS G.A., 1977 – A histochemical study of polysaccharides distribution in eucalypt mycorrhizas. *New Phytol.* 78 : 329-335.

MARGOT J., 1977 – L'épiphyllie des lichens du genre *Strigula* est- elle un cas de parasitisme ? Quelques observations morphologiques. *Lichenologist* 9 : 51-63.

MODENESI P., LAJOLO L. and DONDERO G., 1986 – Acid carbohydrates in the hypothallus of *Catillaria bouteillei* (Desm.) Zahlbr. A histochemical localization. *Cryptogamie, Bryol. Lichénol.* 7 : 1-10.

MODENESI P. and VANZO C., 1986 – The cortical surfaces in *Parmelia saxatilis* and *P. caperata*. A histochemical approach. *Lichenologist* 18 : 329-338.

MOORE-LANDECKER E., 1981 – Histochemical observations on the Discomycete *Pyronema domesticum*, with special references to apothecial ontogeny. *Mycologia* 73 : 310-320.

MOTTA J.J., 1969 – Cytology and morphogenesis in the rhizomorph of *Armillaria mellea*. *Amer. J. Bot.* 56 : 610-619.

NAMBA M., DANNENBERG A.M. and TANAKA F., 1983 – Improvement in the histochemical demonstration of acid phosphatase, β-galactosidase and non specific esterase in glycol methacrylate tissue sections by cold temperature embedding. *Stain Technol.* 58 : 207-213.

PEARSE A.G.E., 1985 – Histochemistry, theoretical and applied. London : Churchill-Livingstone.

SANTESSON R., 1952 – Foliicolous lichens I. A revision of the taxonomy of the obligately foliicolous lichenized fungi. *Symb. Bot. Upsal.* 12 : 1-590.

SASS J.E., 1958 – Botanical microtechnique. Ames : Iowa State University Press.

SCHNEPF E., 1974 - Gland cells. *In* : W. ROBARDS, Dynamic aspect of plant ultrastructure. London : Mc Graw-Hill. Pp. 331-355.

ANTAGONISTES ET HYPERPARASITES DU *FULVIA FULVA* (COOKE) CIFERRI

Interactions mycéliennes avec les champignons colonisant les taches de cladosporiose de la tomate

par Daniel LE PICARD, Yves TIRILLY et Bernard TRIQUE*

RÉSUMÉ. - Les observations en microscopie photonique montrent que des *Acremonium*, *Verticillium* et *Fusarium* vivent en cohabitation ou antagonisme discret avec le *Fulvia fulva*; par contre, les hyphes de l'*Hansfordia pulvinata* et de deux *Acremonium* se comportent en hyperparasites, réalisant des figures d'enroulement et même de pénétration. La microscopie électronique à balayage révèle que l'*H. pulvinata*, après une phase biotrophe, devient nécrotrophe, vidant le contenu cytoplasmique du *F. fulva*. Il est le plus apte à être utilisé en lutte biologique.

SUMMARY. - The observations in light microscopy show that some *Acremonium*, *Verticillium* and *Fusarium* are living in cohabitation or slight antagonism with *Fulvia fulva*; on the other hand, the hyphae of *Hansfordia pulvinata* and of two species of *Acremonium* act as hyperparasites : they realize coilings and even penetrations. The scanning electronic microscopy reveals that *H. pulvinata*, after a biotrophic phase, becomes necrotrophic, draining the cytoplasmic content of *F. fulva*. It is the most suitable to be used in biological control.

MOTS CLÉS : Antagonisme mycélien, cladosporiose, *Fulvia fulva*, *Hansfordia pulvinata*, hyperparasitisme, lutte biologique, tomate.

INTRODUCTION

La cladosporiose de la tomate, due au *Fulvia fulva* (Cooke) Ciferri (syn. : *Cladosporium fulvum* Cooke) provoque des dégâts de plus en plus importants dans les cultures en serre.

Dès 1978, nous avions observé, pour la première fois en France, que l'*Hansfordia pulvinata* (Berk. et Curt.) Hughes (syn. : *H. grisella* (Sacc.) Hughes) était capable de couvrir d'un discret duvet blanc grisâtre les taches sporulées de *F. fulva*, inhibant le développement de ce parasite (PERESSE & LE PICARD,

* Laboratoire de Microbiologie appliquée, Faculté des Sciences et Techniques, 29287 Brest Cedex.

1979). Nous avons alors préconisé l'utilisation de cette aptitude pour mettre au point un procédé de lutte biologique (PERESSE & LE PICARD, 1980).

Plusieurs autres champignons appartenant aux genres *Acremonium*, *Fusarium*, *Verticillium* ont été, par la suite, isolés des taches foliaires de cladosporiose.

Le but de cette étude est de mieux cerner les relations étroites pouvant s'établir entre le *Fulvia fulva* et ces divers champignons, notamment l'*Hansfordia pulvinata*. L'examen des interactions mycéliennes permet en effet de préciser l'intérêt respectif des différentes espèces dans le cadre du développement d'une lutte biologique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention des isolats

Des essais d'isolement ont été réalisés à partir de mycélium recouvrant les taches de cladosporiose. Les prélèvements ont été faits sur plants de tomate cultivés en serre dans la région brestoise, en 1978, pour l'*Hansfordia pulvinata*, entre 1983 et 1986 pour les autres champignons.

Milieux de culture

Les isolats ont été entretenus sur P.D.A. ou extrait de malt gélosé à 2 p. 100.

Les microcultures en milieu liquide ont été effectuées en utilisant la technique des «gouttes pendantes» (PERESSE & LE PICARD, 1980).

Infections expérimentales en chambre climatisée

Des cultures de plants de tomate de la variété «Luca» ont été menées en chambre climatisée selon des conditions précédemment décrites (TIRILLY & TRIQUE, 1984). Des plants âgés de cinq à sept semaines sont infectés par pulvérisation d'une suspension de 5.10^3 spores/ml de *F. fulva* à la face inférieure des feuilles. Trois semaines plus tard, les autres champignons sont apportés par pulvérisation d'une suspension de 10^6 spores/ml au niveau des taches sporulées du *F. fulva*.

Examen des interactions mycéliennes «in vitro»

Une suspension de spores de *F. fulva* est étalée sur milieu P.D.A. en boîte de Pétri. Le même jour, ou 2 jours plus tard, est apporté un fragment mycélien du champignon à tester. Les zones d'inhibition et les recouvrements mycéliens sont notés après une semaine d'incubation à 22°C.

L'observation microscopique des interactions est faite sur lame de verre : de petits blocs de P.D.A. ou d'extrait de malt gélosé distants de 3 mm sont ensemencés, l'un par le *F. fulva*, l'autre par l'autre champignon, puis recouverts d'une lamelle. Ce dispositif permet une bonne observation.

Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à balayage

Après vérification au microscope photonique, les zones présentant des figures de contact, en boîte de Pétri ou sur feuille de tomate, sont prélevées. Les échan-

tillons sont fixés par passages successifs dans une solution de glutaraldéhyde (à 4 % dans un tampon phosphate pH 7,2, 1 h 30 mn) et d'osmium (à 2 %, 1 h). Ils sont ensuite déshydratés dans une série de dilutions d'alcool éthylique, puis d'acétone, portés au point critique et métallisés à l'or.

Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope Jeol JSM 35 à 15 kV.

RÉSULTATS

1. INTERACTIONS OBSERVÉES EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Lors des essais d'infection en chambre climatisée, tous les champignons testés ont révélé la même aptitude que dans la nature à s'implanter sur les taches sporulées de cladosporiose.

Les observations microscopiques permettent cependant de reconnaître deux catégories : les antagonistes et les hyperparasites.

— **Les antagonistes** : des *Acremonium*, *Verticillium* et un *Fusarium* provoquent, du fait du recouvrement, une granulation et une vacuolisation du cytoplasme du *F. fulva*. L'atteinte du parasite est irrégulière et lente; on trouve tous les termes de passage entre une cohabitation et un antagonisme discret qui ne s'accompagne pas de mécanismes hyperparasitaires. Aucune des souches concernées ne montre de figures d'enroulements ou de pénétration du mycélium et des spores du *F. fulva*.

— **Les hyperparasites** : seules trois espèces fongiques ont provoqué des figures d'hyperparasitisme à l'égard du *F. fulva*.

Un *Acremonium* sp. a établi des contacts suivis d'enroulements et de pénétration des hyphes et des spores du *F. fulva* puis d'un développement intramycélien.

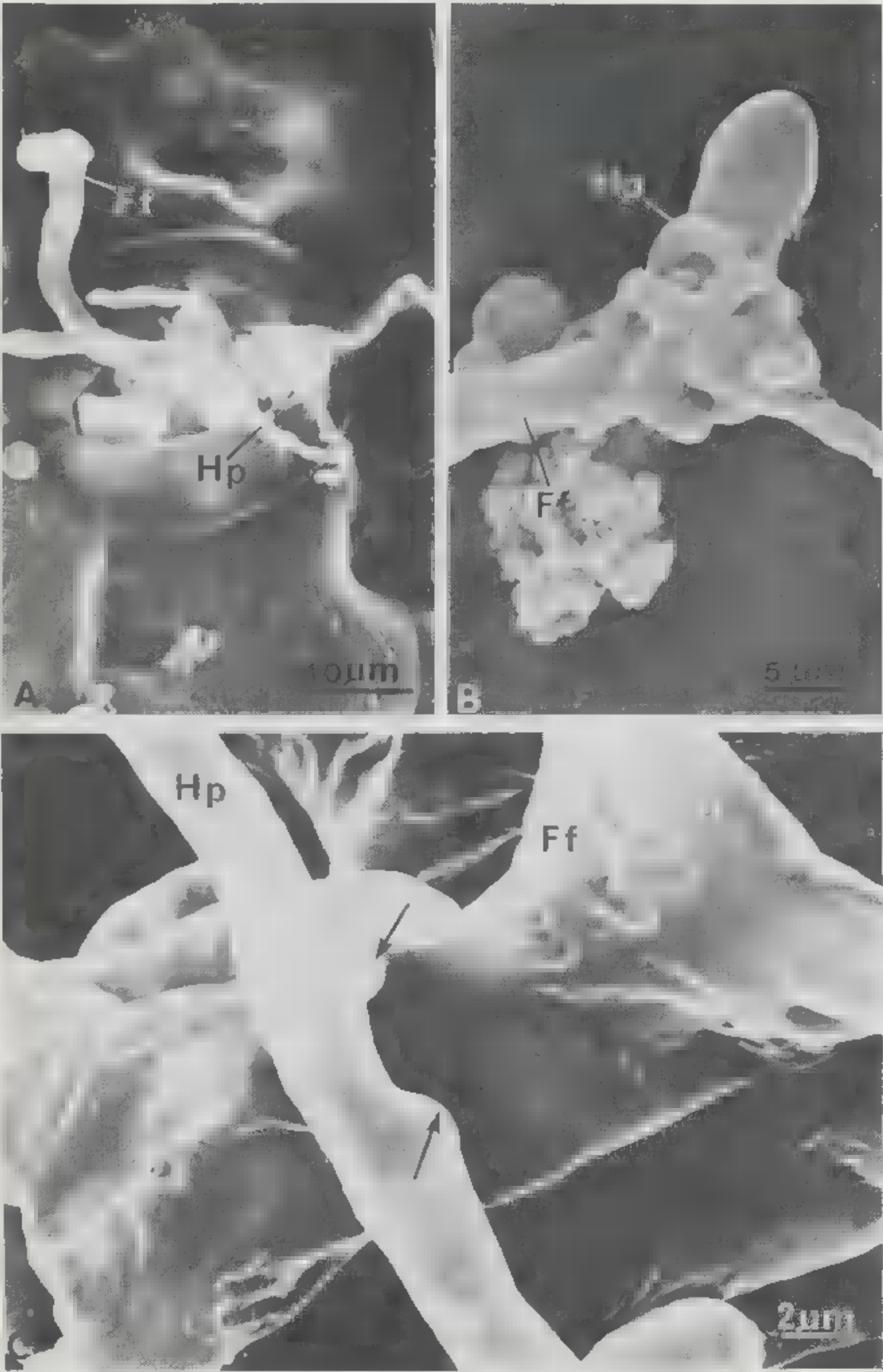
Les attaques d'un autre *Acremonium*, que nous rapportons à l'espèce *A. strictum* W. Gams (syn. : *Cephalosporium acremonium* auct. plur.), en diffèrent par une fréquence plus grande des figures d'enroulement et par une croissance intramycélienne plus rare.

Dans tous les cas, le parasitisme de l'*Hansfordia pulvinata* manifeste ses effets beaucoup plus rapidement : il est capable de recouvrir les taches de *F. fulva* et de provoquer sa mort dans les 3 ou 4 jours qui suivent son apport. Le mycélium et les spores du *F. fulva* apparaissent vides et déformés.

Les filaments des hyperparasites sont apparus particulièrement fins (diamètre moyen : 2 à 3 µm contre 4 à 5 µm pour le *F. fulva*).

2. OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE

L'*Hansfordia pulvinata* offrant le plus d'intérêt dans l'optique d'une lutte biologique contre la cladosporiose de la tomate, nous avons limité nos observations en microscopie électronique aux confrontations *H. pulvinata* - *F. fulva*


Ff
Hp
10µm
A
Hp
Ff
5 µm
B
Hp
Ff
2µm

tant sur du matériel infecté naturellement que sur des taches résultant d'infections expérimentales.

Dès l'émergence des hyphes du *F. fulva* par les stomates de la feuille de tomate, l'*H. pulvinata* peut établir des contacts avec son hôte (Fig. 1, A). Dans une première phase biotrophe, les filaments de l'*H. pulvinata* émettent en direction du *F. fulva* des rameaux télémorphiques qui viennent s'enrouler autour des hyphes et des spores de ce dernier, constituant des nœuds plus ou moins complexes (Fig. 1, B). Ces filaments présentent, de part en part, des renflements se réduisant à de petits boutons fortement appliqués contre les hyphes de l'hôte, jouant ainsi le rôle d'appressorium (Fig. 2, A-B). Des digitations sont observables sur la paroi de l'hyperparasite au niveau des zones de contact, mais il n'apparaît pas d'orifice mettant en relation les deux cytoplasmes (Fig. 2, B).

Le processus se poursuit par une phase nécrotrophe au cours de laquelle le cytoplasme du champignon parasité se vacuolise et devient granuleux. Cette étape déjà observable en microscopie photonique précède la mort des articles mycéliens et des spores atteintes qui, vidées de tout contenu cytoplasmique, présentent des parois affaissées.

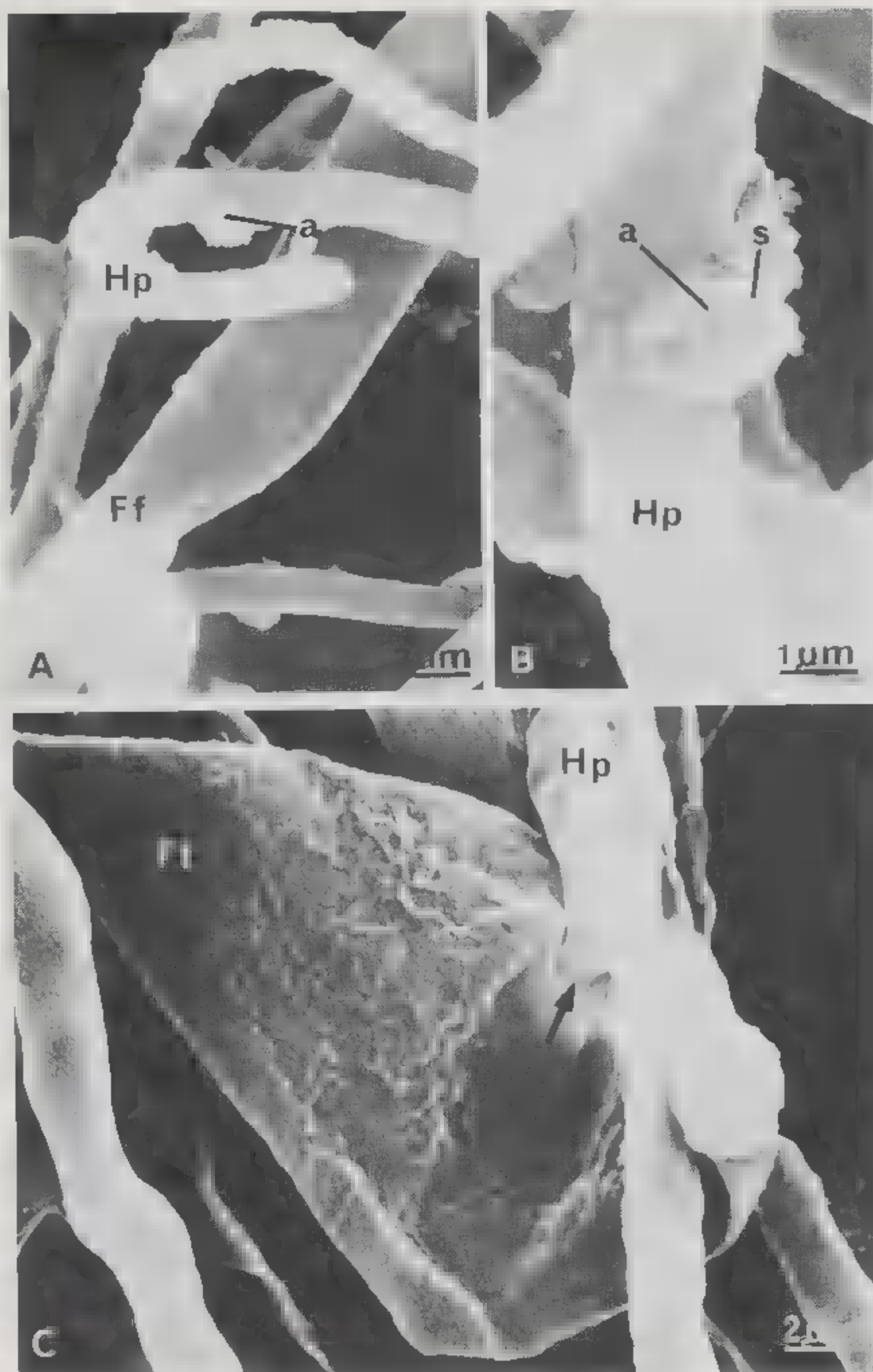
Quelques rares figures de pénétration de l'*H. pulvinata* dans les éléments du *F. fulva* ont été observées (Fig. 2, C) sans qu'un développement intramycélien s'en suive.

DISCUSSION

Parmi les champignons que nous avons isolés des taches de cladosporiose de la tomate, seules trois espèces révèlent une réelle aptitude parasitaire. Les autres, qui envahissent surtout les taches âgées, sont des saprophytes foliaires dont le développement est favorisé localement par la présence de vieux filaments plus ou moins autolysés de *F. fulva* et par les nécroses des tissus foliaires sous-jacents. Le mycoparasitisme de ces trois espèces se développe de façon différente. «In vivo» et «in vitro», les contacts, nombreux sur feuille de tomate, sont plus rares sur milieux gélosés, en particulier pour les *Acremonium*. Par ailleurs, en milieu liquide, seul l'*H. pulvinata* peut parasiter le *F. fulva*. Mais comme le soulignent KAPOORIA & MENDGEN (1985), lors d'études sur *Uromyces fabae* (Persoon)

Figure 1 – A. Dès leur sortie par les stomates de la feuille de tomate, les hyphes de *Fulvia fulva* (F. f.) sont parasitées par celles d'*Hansfordia pulvinata* (H. p.). B. Le mycélium d'*Hansfordia pulvinata* (H. p.) s'enroule autour des filaments du *Fulvia fulva* (F. f.) y constituant de véritables nœuds. C. Au niveau des contacts, l'*Hansfordia pulvinata* (H.p.) développe de petits appressoria (flèches).

Figure 1 – A. Immediately after their outburst through the leaf stromata of tomato, the hyphae of *Fulvia fulva* (F. f.) are parasitized by hyphae of *Hansfordia pulvinata* (H. p.). B. *Hansfordia pulvinata* (H. p.) mycelium coils around the filament of *Fulvia fulva* (F. f.) making real knots. C. At the place of contacts, *Hansfordia pulvinata* (H. p.) shows small appressoria (arrows).


a
Hp
Ff
A
a
s
Hp
B
1µm
Hp
C

Schroeter, la composition des parois d'un champignon peut varier selon les conditions de culture et interférer avec sa pathogénicité. Ceci peut également expliquer la perte de capacité mycoparasitaire d'une de nos souches d'*Acremonium* après plusieurs repiquages.

Les figures d'hyperparasitisme que nous avons observées sont similaires à celles décrites par d'autres auteurs : des interactions caractérisées par des enroulements d'hyphes mycéliennes suivis ou non de pénétrations sont connues chez de nombreuses espèces en présence d'autres champignons, notamment chez le *Rhizoctonia solani* Kühn (BUTLER, 1957), le *Gliocladium roseum* Bain. (BARNETT & LILLY, 1962), les *Trichoderma* (DENNIS & WEBSTER, 1971), le *Gonatobotrys simplex* Cda (HOCH, 1977b), le *Calcarisporium parasiticum* Barnett (HOCH, 1977a), le *Stephanoma phaeospora* Butler et Mc Cain (HOCH, 1978), le *Nematogonum ferrugineum* (Pers.) Hughes (WALKER & al., 1982) ou l'*Acladium tenellum* (Berk. et Curt.) Subram. (KUYKENDAL & al., 1983). On retrouve là les divers types de confrontations décrits par MOREAU C. & M. (1956).

Les premiers articles du *F. fulva* meurent 3 à 4 jours après l'apport de l'*H. pulvinata*. Une granulation et une vacuolisation des hyphes et des spores de l'hôte sont souvent notées. Ces phénomènes sont tardifs et précèdent de peu la destruction des articles concernés. Les parasites du *Rhizoctonia solani* (CHAND & LOGAN, 1984) montrent les mêmes diversités et méthodes d'attaque. Les hyperparasites du *F. fulva* sont nécrotrophes au sens défini par BARNETT & BINDER (1973) comme le sont de nombreuses espèces d'*Acremonium* décrites par RUDAKOV (1978).

La croissance de l'*Hansfordia* paraît stimulée par la présence du *F. fulva* dès le contact entre l'hôte et son parasite. Comme il y a peu de communications entre les filaments mycéliens, le mode d'action de l'*H. pulvinata* serait au moins partiellement lié à l'élaboration d'un sesquiterpène, qui a déjà été isolé des filtrats de culture, la désoxyphoménone (TIRILLY & al., 1983). En outre, une action au niveau des parois cellulaires et des membranes a été notée : la toxine favoriserait les activités glucanasiques et chitinasiques de l'hyperparasite (TIRILLY, résultats non publiés).

Parmi les champignons colonisant les taches de cladosporiose de la tomate, l'*Hansfordia pulvinata*, par ses caractères de croissance rapide et d'interactions mycéliennes, paraît le plus apte à être utilisé pour une lutte biologique.

Figure 2 — A. Après rupture artificielle des contacts, on observe distinctement l'appressorium (a) porté par une hyphe mycélienne d'*Hansfordia pulvinata* recourbée en crochet. B. Détail de l'appressorium (a) qui présente une surface de contact (s) digitée. C. Pénétration (flèche) d'une hyphe d'*Hansfordia pulvinata* (H. p.) dans une spore de *Fulvia fulva* (F. f).

Figure 2 — A. After artificial rupture of contacts, the appressorium (a) appears distinctly bore by an hypha of *Hansfordia pulvinata* (H. p.) B. Detail of appressorium (a) presenting a digitated contact surface (s). C. Penetration (arrow) of an hypha of *Hansfordia pulvinata* (H. p.) in a spore of *Fulvia fulva* (F. f.).

BIBLIOGRAPHIE

BARNETT H.L. and BINDER F.L., 1973 – The fungal host-parasite relationship. *Annual Rev. Phytopathol.* 11 : 273-292.

BARNETT H.L. and LILLY V.C., 1962 – A destructive mycoparasite, *Gliocladium roseum. Mycologia* 54 : 72-77.

BUTLER E.E., 1957 – *Rhizoctonia solani* as a parasite of fungi. *Mycologia* 49 : 354-373.

CHAND T. and LOGAN C., 1984 – Antagonists and parasites of *Rhizoctonia solani* and their efficacity in reducing stem canker of potato under controlled conditions. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 83 : 107-112.

DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 – Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma.* III. Hyphal interaction. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 : 363-369.

HOCH H.C., 1977a – Mycoparasitic relationships. III. Parasitism of *Physalospora obtusa* by *Calcarisporium parasiticum. Canad. J. Bot.* 55 : 198-207.

HOCH H.C., 1977b – Mycoparasitic relationships. *Gonatobotrys simplex* parasitic on *Alternaria tenuis. Phytopathology* 67 : 370-379.

HOCH H.C., 1978 – Mycoparasitic relationships. IV. *Stephanoma phaeospora* parasite on a species of *Fusarium. Mycologia* 70 : 370-379.

KAPOORIA R.G. and MENDGEN K., 1985 – Infection structures and their surface changes during differenciation in *Uromyces fabae. Phytopathol. Z.* 113 : 317-323.

KUYKENDAL W.R., HINDAL D.F. and BARNETT H.L., 1983 – Parasitism and nutrition of the contact mycoparasite *Acladium tenellum. Mycologia* 75 : 656-665.

MOREAU C. et MOREAU M., 1956 – Alliances et antagonismes entre champignons. Leur intérêt pour la compréhension de certains problèmes phytopathologiques. *Bull. Soc. Mycol. France* 72 : 250-253.

PERESSE M. et LE PICARD D., 1979 – Une expérience de lutte biologique contre la cladosporiose de la tomate. *P.H.M. Revue Horticole* 197 : 64.

PERESSE M. et LE PICARD D., 1980 – *Hansfordia pulvinata*, mycoparasite destructeur du *Cladosporium fulvum. Mycopathologia* 71 : 23-30.

RUDAKOV O.L., 1978 – Physiological groups in mycophilic fungi. *Mycologia* 70 : 150-159.

TIRILLY Y., KLOOSTERMAN J., SIPMA G. and KETTENES - VAN DEN BOSCH J.J., 1983 – Fungitoxic sesquiterpene from *Hansfordia pulvinata. Phytochemistry* 22 : 2082-2083.

TIRILLY Y. et TRIQUE B., 1984 – Production d'enzymes lytiques d'une toxine par le *Hansfordia pulvinata*, hyperparasite du *Cladosporium fulvum. Agronomie* 4 : 200.

WALKER J.C., JONES T.G. and HEDGER J.N., 1982 – Preliminary studies on the contact mycoparasite *Nematogonum ferrugineum. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 78 : 374-378.

EFFECT OF SOME PHENOLIC COMPOUNDS ON SPORE GERMINATION AND GERM-TUBE LENGTH OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* AND *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *LYCOPERSICI*

by Ismail Mohamed Kamel ISMAIL, Abdel-Aziz Mahmoud SALAMA,
Mohamed Ibrahim Ahmed ALI and Salama Abu-Elyazeed OUF*

ABSTRACT. — The effects of 12 different phenolic compounds on the percentage germination and germ-tube lengths of spores of *Aspergillus fumigatus* Fresenius and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen were studied. The results indicate that the compounds vary in their inhibitory action on the spores of these two fungi depending on dosage, the organism under test and the chemical structure of the compounds. Gallic acid, resorcinol, *m*-digallic acid and hydroquinone insignificantly affected the percentage spore germination of both fungi, even at high concentrations. The remaining compounds, on the other hand, revealed different inhibitory levels which could be arranged from the least inhibitory compound to the most in the order pyrogallol, 2,4-dinitrophenol, phenol, salicylic acid, *p*-cresol, *m*-cresol, *o*-cresol and *o*-nitrophenol. The effects of the 12 phenolic compounds on the germ-tube lengths of the two fungi were generally similar to those of spore germination.

RÉSUMÉ. — Étude de l'effet de 12 composés phénoliques sur la germination et la croissance des tubes germinatifs d'*Aspergillus fumigatus* Fresenius et de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen. Les résultats indiquent que ces composés ont des effets inhibiteurs variables sur les spores des deux champignons, qui dépendent des doses appliquées, de l'organisme testé et de la structure chimique du composé. L'acide gallique le résorcinol, l'acide tannique et l'hydroquinone, ont un effet insignifiant sur le pourcentage de germination des spores des deux champignons, même à des concentrations élevées. Par contre, les autres composés sont inhibiteurs à différents niveaux, et peuvent être classés du moins inhibiteur au plus inhibiteur comme suit : pyrogallol, 2,4-dinitrophenol, phenol, acide salicylique, *p*-cresol, *m*-cresol, *o*-cresol, et *o*-nitrophenol. Généralement, l'effet des 12 composés phénoliques sur la croissance des tubes germinatifs est semblable à celui observé sur la germination des spores.

KEY WORDS : Phenolic compounds, spore germination, germ-tube length, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, gallic acid, resorcinol, *m*-digallic acid, hydroquinone, pyrogallol, phenol, 2,4-dinitrophenol, salicylic acid, *o*-nitrophenol, *o*-cresol, *m*-cresol, *p*-cresol.

* Department of Botany, Faculty of Science, University of Cairo, Egypt.

INTRODUCTION

Phenolic compounds are known to be toxic to a great number of micro-organisms. Biocides containing phenolic group(s) in their structure have been used in pest control such as dinitrocresol (VERONA, 1950) and fluometuron (cotoran or [3-(3-trifluoromethyl phenyl)-1,1 dimethyl urea]) (TWEEDY & LEOPPKY, 1968; NAGUIB, 1969). SHORTLE & al. (1971) indicated that ortho-dihydroxyphenolic compounds, such as catechol, are much more inhibitory to *Phialophora melinii* than are meta- or para-dihydroxyphenols, such as resorcinol and hydroquinone, respectively. Poor growth of *Fomes connatus (Oxyporus populinus)* on gallic acid medium has been reported as characteristic of the fungus (NOBLES, 1948).

Spore germination of *Diplodia gossypina* was reduced greatly by catechol, catechin, coumarin, as well as tannic, chlorogenic, D(-) quinic, gallic, or caffeic acids and to a lesser extent by resorcinol and pyrogallol (WANG & PINCKARD, 1973).

PATIL & al. (1964) indicated that the quinone form of chlorogenic acid, even at low concentrations, was toxic to spore germination of *Verticillium albo-atrum* and that polymerized products had little toxicity. ISMAIL & MICHALIKOVA (1977) studied the effect of some phenolic compounds on spore germination of *Helminthosporium sativum* and showed that 2,4-dinitrophenol, 8-hydroxyquinoline and pyrocatechin were significantly stimulatory to spore germination at low concentrations, while they were significantly inhibitory at higher concentrations. They also found that salicylic acid, gallic acid and tannin activated spore germination of *H. sativum* with highly significant differences. ORELLANA & THOMAS (1965) reported that gallic acid may promote germination, growth and sporulation of *Botryotinia ricini*. VIDHYASEKARAN (1974) showed that oxidized phenolics markedly inhibited spore germination, mycelial growth and the activity of pectic and cellulolytic enzymes of *Helminthosporium* sp.

In the literature, there exist a number of studies dealing with phenolic compounds as enzyme inactivators or inhibitors (PATIL & DIMOND, 1967; RAVISE & KIRKIACHARIAN, 1976).

Phenolic compounds are widely distributed in higher plants and fungi. Mostly, they represent polymerized terminal products of secondary metabolism. The variety of structure they offer provides a basis for a degree of specificity as antimicrobial agents (BILGRAMI & DUBE, 1976). Therefore, phenols or tannins have been implicated as possible cause of disease resistance in plants (WALKER & STAHMANN, 1955). Phenolic compounds accumulate rapidly during host-parasite interactions (CRUICKSHANK, 1980) and can mediate disease suppression through inactivation of fungal enzymes or strengthening of plant structural components (LEATHAM & al., 1980). LINK (1933) reported that coloured onion varieties resistant to *Colletotrichum circinans* (causal organism of smudge disease) contained more catechol and protocatechuic acid in their bulb scales than did less resistant varieties. Later, WALKER & LINK (1935) found that

these two compounds were toxic to the organism *in vitro* and revealed, when testing other phenolic compounds on *C. circinans* and 3 other fungi, that toxicity of such compounds was dependent on the molecular structure of the phenol.

In this paper we report the effects of twelve phenolic compounds on *Aspergillus fumigatus* Fresenius and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen. This is a preliminary study to determine the significance of use of plant residues rich in phenolic contents instead of chemical phenolic compounds as a method for controlling plant diseases through soil amendment with these plant residues. This is our future goal.

MATERIALS AND METHODS

Organisms

Two fungi were selected for the study : *Aspergillus fumigatus* Fresenius and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hansen. The former organism was isolated from Egyptian soil and chosen due to the high percentage germination of its conidia, its sensitivity to fungicides and saprophytic nature. These characters were valuable in using this organism for comparison with the pathogenic fungi. The latter organism, an important plant pathogen causing tomato wilt in Egypt, was isolated from infected tomato plants in Egypt.

Phenolic compounds

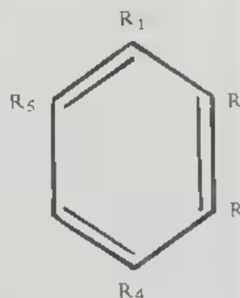
Twelve phenolic compounds were used, each in seven concentrations namely 0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ppm.

For each treatment of each phenolic compound, 7 erlenmeyer flasks (250 ml) each containing 90 ml of previously prepared Czapek's agar medium (THOM & RAPER, 1945) were melted and cooled to about 50°C. Each of 6 flasks received 10 ml of previously prepared stock solutions of the phenolic compounds. The flasks were then shaken to assure uniform distribution yielding the above mentioned concentrations for each phenolic compound. To the 7th flask 10 ml of sterile distilled water were added to serve as a control. Sufficient amount of the mixture in each of the 7 flasks was then poured into each of 4 sterile Petri plates (90 mm diameter) to form upon solidification a thin layer at the bottom.

Two plates were surface inoculated with 1 ml spore suspension of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the remaining duplicate were inoculated with *Aspergillus fumigatus*. All plates were then incubated at 27°C.

The following phenolic compounds were chosen for the present study :

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
1 phenol	OH	H	H	H	H
2 resorcinol	OH	H	OH	H	H
3 hydroquinone	OH	H	H	OH	H
4 pyrogallol	OH	OH	OH	H	H
5 *o*-cresol	OH	CH_3	H	H	H
6 *m*-cresol	OH	H	CH_3	H	H
7 *p*-cresol	OH	H	H	CH_3	H
8 *o*-nitrophenol	OH	NO_2	H	H	H
9 2,4-dinitrophenol	OH	NO_2	H	NO_2	H
10 salicylic acid	OH	COOH	H	H	H
11 gallic acid	OH	OH	H	COOH	OH
12 *m*-digallic acid	OH	OH	H	$C_8H_5O_6$	OH



Preparation of spore suspension

Both *Fusarium* and *Aspergillus* spp. were separately inoculated into fresh plates of Czapek's agar medium (THOM & RAPER, 1945) and the plates were incubated at 25°C for 7 days. The spores were harvested from margins of the colonies using a sterile needle and transferred into test tubes containing 5 ml of sterile distilled water. The tubes were manually shaken for 5 min. to allow for even dispersal of spores.

Estimation of percentage germination

Several preliminary trials were made to estimate the time interval (in hours) needed for the control of each species to give about 50 % germination. This estimated time interval was carried out in separate control plates and was taken as a limit at which the variously treated plates were examined. This estimated time interval for controls was found to be 13.5 hrs for *Aspergillus fumigatus* and 4.5 hrs for *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

By the end of the needed incubation period 2 agar blocks from each plate were removed on labelled slides and transferred to a desiccator with a vapour of formalin to fix and kill the spores. Four microscopic fields (magnification power x 100) per block were then examined at random for their content of percentage germinated spores and lengths of germ-tubes in microns (i. e. 16 readings for each treatment).

RESULTS

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*

Table 1 shows the average values of percentage spore germination at different concentrations of each of the studied phenolic compounds. The increase in

TABLE I

Effect of different concentrations of some phenolic compounds on percentage spore germination (% germ., control = 51.66 %) and length of germ tube µm (g. t. leng., control = 18.64 µm) of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* after 4.5 hrs on Czapek's medium at 27°C.

TABLEAU 1

Effet de différentes concentrations de quelques composés phénoliques sur la germination des spores (% germ., témoin = 51,66 %) et la croissance des tubes germinatifs µm (g.t. leng., témoin = 18,64µm) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* après 4,5 h sur milieu de Czapek à 27°C.

Phenol's number	10 ppm		50 ppm		100 ppm		250 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.
1	52.66	18.57	50.25	17.65	44.25	15.37	29.33	14.15	6.33	9.99	0.00	0.00
2	53.33	19.17	52.25	18.97	49.66	18.51	49.50	18.48	49.00	18.48	48.25	18.31
3	53.33	18.10	52.66	18.77	51.33	18.74	50.00	18.57	49.33	18.57	49.00	18.48
4	52.33	18.77	50.66	18.74	43.33	16.59	35.50	14.05	22.25	10.36	5.25	9.63
5	47.00	17.88	43.33	13.56	23.33	10.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	47.50	17.95	44.00	14.05	26.33	11.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	49.25	18.15	45.33	16.23	29.33	12.87	15.25	9.53	0.00	0.00	0.00	0.00
8	43.33	16.20	18.33	10.56	5.50	7.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	47.33	17.65	46.66	17.19	40.66	14.68	36.50	13.89	16.33	10.62	0.00	0.00
10	50.66	18.44	49.25	17.25	43.25	16.56	37.33	14.25	2.66	6.79	0.00	0.00
11	51.00	16.43	48.25	14.28	48.25	13.20	48.00	11.22	47.66	10.56	47.50	9.93
12	54.33	19.04	52.66	18.87	51.66	18.81	51.33	18.21	51.33	17.85	51.00	17.58

Least significant difference (L.S.D.)	Between treatments		Within treatment	
	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.
at p = 0.05	10.06	3.29	7.68	2.52
at p = 0.01	14.21	4.65	10.85	3.55

TABLE 2

Effect of different concentrations of some phenolic compounds on percentage spore germination (% germ., control = 48.75 %) and length of germ tube µm (g. t. leng., control = 25.27 µm) of *A. fumigatus* after 13.5 hrs on Czapek's medium at 27°C.

TABLEAU 2

Effet de différentes concentrations de quelques composés phénoliques sur la germination des spores (% germ., témoin = 48.75 %) et la croissance des tubes germinatifs µm (g.t. leng., témoin = 25,27 µm) d'*Aspergillus fumigatus* après 13,5 h sur milieu de Czapek à 27°C.

Phenol's number	10 ppm		50 ppm		100 ppm		250 ppm		500 ppm		1000 ppm	
	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.
1	45.00	22.53	26.66	14.38	20.25	13.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	52.50	25.47	51.66	25.27	44.66	20.49	42.50	19.49	41.33	19.30	41.33	18.90
3	56.50	26.43	52.50	25.41	48.33	24.51	45.50	22.83	43.66	21.84	43.00	20.49
4	48.25	23.79	47.33	23.16	43.50	16.23	38.50	13.62	6.33	8.94	0.00	0.00
5	38.00	19.53	26.33	13.86	19.25	12.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	38.66	19.76	27.25	14.22	19.75	13.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	40.33	21.28	30.75	14.52	23.33	13.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8	33.75	15.84	1.66	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
9	43.66	21.32	41.25	18.94	40.50	14.81	28.50	13.79	0.00	0.00	0.00	0.00
10	47.50	23.82	45.33	22.47	30.66	15.24	24.00	13.22	0.00	0.00	0.00	0.00
11	57.33	26.10	50.33	25.50	48.50	25.08	48.00	24.81	45.00	24.75	42.33	24.15
12	53.33	26.23	54.33	25.80	50.25	25.44	50.00	25.34	50.00	25.08	49.33	24.53

Least significant difference (L.S.D.)	Between treatments		Within treatment	
	% germ	g. t. leng.	% germ	g. t. leng.
at p = 0.05	9.29	4.41	7.10	3.36
at p = 0.01	13.12	6.22	10.02	4.75

concentration of certain compounds resulted in a decrease percentage of spore germination, while that of other compounds was of little or no influence. Therefore, the phenolic compounds included in this study were grouped into two categories based on their effect on percentage spore germination. These were (a) gallic acid, resorcinol, tannic acid (*m*-digallic acid) and hydroquinone which revealed no significant effects as compared to their respective control values; (b) pyrogallol, 2,4-dinitrophenol, phenol, salicylic acid, *p*-cresol, *m*-cresol, *o*-cresol, *o*-nitrophenol. The lethal dosages of such compounds were 1000 ppm for the first 4 compounds except for that of pyrogallol which was more than 1000 ppm, 500 ppm for *p*-cresol and 250 ppm for the last 3 compounds.

It appears that although most of the studied compounds were lethal to macroconidia of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* at relatively high concentrations (> 50 ppm), none of them, except *o*-nitrophenol, revealed any significant toxicity at lower concentrations (10 & 50 ppm).

The effects of different concentrations of some phenolic compounds studied on the lengths of germ tubes were generally similar to their effects on the percentage spore germination.

At the highest concentration (1000 ppm) almost all compounds in groups (b) were lethal to the macroconidia of this fungus.

Aspergillus fumigatus

All compounds except gallic acid, *m*-digallic acid and hydroquinone variably affected spore germination especially at high concentration (Table 2). Although some of these compounds were lethal even at relatively low concentrations, others were inhibitory only at higher dosages. Resorcinol, gallic acid and hydroquinone were only slightly toxic at the highest concentration (1000 ppm); the latter two compounds revealed statistically significant activation in spore germination of *A. fumigatus* when present at the lowest concentration used (10 ppm). The remaining phenolic compounds possessing more inhibitory effect on spore germination can be arranged according to their effect from the least inhibitory compound to the most in the order pyrogallol, 2,4-dinitrophenol, salicylic acid, *p*-cresol, *m*-cresol, *o*-cresol, *o*-nitrophenol. Complete inhibition of spore germination was achieved at 100 ppm of *o*-nitrophenol, at 250 ppm of cresols and phenol, and at 500 ppm of salicylic acid and 2,4-dinitrophenol. Pyrogallol, however, did not completely inhibit but greatly retarded spore germination at 500 ppm concentration.

The results of the effects of the various phenolic compounds on germ tube lengths of *A. fumigatus* revealed that *m*-digallic acid and gallic acid displayed nc significant effects at any of the concentrations used. Resorcinol and hydroquinone slightly retarded germ tube elongations at the highest concentrations (50C & 1000 ppm). The lengths of germ tubes were greatly reduced by *o*-nitrophenol and to a lesser extent by the cresols and phenol. Pyregallol showed much les: effects on germ tube length than cresols or phenol.

DISCUSSION

Our results indicate clear toxicity variabilities between tested phenolic compounds depending on the dosage, organism under test, period of incubation or contact as well as the chemical structure of the compound. In case of *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, gallic acid, resorcinol, *m*-digallic acid and hydroquinone insignificantly affected the percentage spore germination of both fungi even at high concentrations. The remaining compounds, on the other hand, revealed different inhibitory levels which could be arranged according to their effect from the least inhibitory to the most in the order : pyrogallol, 2,4-dinitrophenol, phenol, salicylic acid, *p*-cresol, *m*-cresol, *o*-cresol, *o*-nitrophenol.

The effects of the 12 tested phenolic compounds on the germ tube lengths of the same two fungi were generally harmonious with those of spore germination.

The toxic effect of phenolic compounds on spore germination *in vitro* was studied by many authors. BILGRAMI & VERMA (1978) reported that a variety of plant products, including phenols, mustard oils, etc. have inhibitory effects on spore germination. SILVIA & SINCLAIR (1983 a-b) stated that a diffusible substance produced by *Laccaria laccata* inhibited mycelial growth and delayed spore germination of *Fusarium oxysporum*. On the other hand, CHEO (1982) stated that while rhizomorph development as well as mycelial growth of the fungus *Armillaria mellea* were strongly stimulated by addition of tannic acid (0.3 to 1 %) to the basal medium, growth of many other fungi was inhibited.

Considering spore germination as the first step or phase of growth, the present work can thus be correlated with published reports dealing with the effects of phenolic compounds on growth of fungi. WALKER & LINK (1935) showed that in the phenol and phenolic acid series, toxicity increased with the molecular weight of the compounds in which the hydroxyl groups are arranged in ortho-position to one another on the benzene nucleus. The reverse being true in those in which the hydroxyl groups stand in meta-position to one another. Hence, phenol, catechol and salicylic acid retarded the growth of all fungi tested. These findings are in agreement with our results where phenol and salicylic acid displayed great inhibitory effects while resorcinol (-OH in *m*-position) resulted in less or no effect. Likewise, SHORTLE & al. (1971) indicated that ortho-dihydroxyphenolic compounds such as catechol, were much more inhibitory to *Phialophora melinii* than were meta- or para-hydroxyphenols, such as resorcinol and hydroquinone respectively. Moreover, LE TOURNEAU & al. (1957) reported that the meta isomer of phenol (resorcinol) had no effect on *V. albo-atrum*, while the para isomer (hydroquinone) reduced growth considerably though not as effective as catechol. On the contrary, we have found that for both fungi hydroquinone (-OH in *p*-position) and resorcinol (-OH in *m*-position) caused negligible effects.

Concerning pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene), LE TOURNEAU & al. (1957) found that it was the most inhibitory compound to V. *albo-atrum* at

1×10^{-4} M. The toxicity of this compound to other fungi had also been reported by others (WALKER & LINK, 1935; GREATHOUSE & RIGLER, 1940). In the present investigation, however, pyrogallol was moderate toxicity to the two fungi studied.

The present study also showed that *o*-cresol was more inhibitory to *A. fumigatus* and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* than *m*-cresol and *p*-cresol, and the three cresols were more toxic than phenol. These data lead to the suggestion that an introduction of a methyl group ($-CH_3$) in ortho-position to the phenol molecule produces a more inhibitory compound than otherwise.

The results also provide an evidence that a nitro group in ortho-position of the phenol molecule (*o*-nitrophenol) produces a more toxic compound than phenol itself. However, the introduction of another nitro group but in the para-position (2,4-dinitrophenol) does not lead to more toxicity than *o*-nitrophenol.

REFERENCES

BILGRAMI K.S. and DUBE H.C., 1976 – *A text book of modern plant pathology*. New Delhi, Vikas Publishing House PVT LTD, 144 p.

BILGRAMI K.S. and VERMA R.N., 1978 – *Physiology of fungi*. New Delhi, Vikas Publishing House PVT LDT, 369 p.

CHEO P.C., 1982 – Effects of tannic acid on rhizomorph production by *Armillaria mellea*. *Phytopathology* 72 : 676-679.

CRUICKSHANK I.A.M., 1980 – Defenses triggered by the invader : Chemical defenses. *In* : HORSFALL J.G. & COWLING E.B., *Plant disease, an advanced treatise*. Vol. V, *How plants defend themselves*. New York, Academic Press : 247-267.

GREATHOUSE G.A. and RIGLER N.E., 1940 – The chemistry of resistance of plant to *Phymatotrichum* root rot. IV. Toxicity of phenolic and related compounds. *Amer. J. Bot.* 27 : 99-107.

ISMAIL I.M.K. and MICHALIKOVA A., 1977 – Effect of phenolic and other compounds on the germination of spores of *Helminthosporium sativum* Pam., King et Bakke *in vitro*. *Polnohospodarstvo (Nitra)* 23 : 18-33.

LEATHAM G.F., KING V. and STAHMANN M.A., 1980 – *In vitro* protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes. *Phytopathology* 70 : 1134-1140.

LE TOURNEAU D., McLEAN J.G. and GUTHRIE J.W., 1957 – Effect of some phenols and quinones on growth *in vitro* of *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 47 : 602-606.

LINK K.P., 1933 – The isolation of catechol from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. *J. Biol. Chem.* 100 : 379-383.

NAGUIB M.I., 1969 – Effect of sevin on the metabolism of *Rhizoctonia solani*. *U.A.R. J. Bot.* 11 : 7-18.

NOBLES M.K., 1948 – Identification of cultures of wood-rotting fungi. Studies in forest pathology. *Canad. J. Res., Sect. C. Bot. Sci.* 26 : 281-431.

ORELLANA R.G. and THOMAS C.A., 1965 – Effect of gallic acid on germination, growth and sporulation of *Botryotinia ricini*. *Phytopathology* 55 : 468-470.

PATIL S.S., POWELSON R.L. and YOUNG R.A., 1964 – Relation of chlorogenic acid and free phenols in potato roots to infection by *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology* 54 : 531-535.

PATIL S.S. and DIMOND A.E., 1967 – Inhibition of *Verticillium* polygalacturonase by oxidation products of polyphenols. *Phytopathology* 57 : 492-496.

RAVISE A. and KIRKIACHARIAN B.S., 1976 – Influence of structure of phenolic compounds on the inhibition of *Phytophthora parasitica*. II. Coumarins. *Phytopathology* 66 : 314-326.

SHORTLE W.C., TATTAR T.A. and RICH A.E., 1971 – Effects of some phenolic compounds on the growth of *Phialophora melinii* and *Fomes connatus*. Phytopathology 61 552-555.

SILVIA D.M. and SINCLAIR W.A., 1983a – Suppressive influence of *Laccaria laccata* on *Fusarium oxysporum* and on Douglass-fir seedlings. *Phytopathology* 73 : 384-389.

SILVIA D.M. and SINCLAIR W.A., 1983b – Phenolic compounds and resistance to fungal pathogens induced in primary roots of Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. *Phytopathology* 73 : 390-397.

THOM C. and RAPER K.B., 1945 – *A manual of the Aspergilli*. Baltimore, Williams and Wilkins Co., 373 p.

TWEEDY B.G. and LEOPPKY C., 1968 – The use of C^{14}-labelled glucose, glucuronate and acetate to study the effect of atrazine, simazine and fluometuron on glucose catabolism in selected plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 58 : 1522.

VERONA D., 1950 – Effect of some selective weed-killers in microorganisms with special reference to those of the soil. *Soils & Fertilizers* 13 : 53-237.

VIDHYASEKARAN P., 1974 – Pathophysiology of the resistance of finger-millet to helminthosporiose. *Indian J. Agric. Sci.* 44 : 434-436.

WALKER J.C. and LINK K.P., 1935 – Toxicity of phenolic compounds to certain onion bulb parasites. *Bot. Gaz. (Crawfordsville)* 96 : 468-484.

WALKER J.C. and STAHMANN M.A., 1955 – Chemical nature of disease resistance in plants. *Annual Rev. Pl. Physiol.* 6 : 351-366.

WANG S.C. and PINCKARD J.A., 1973 – Spore germination of *Diplodia gossypina* in the presence of carbohydrates and phenolic compounds in relation to boll rot of cotton. *Phytopathology* 63 : 1181-1185.

NOTAS SOBRE HIFOMICETOS ACUATICOS SAPROFITOS EN RESTOS VEGETALES

por A. ROLDÁN*, E. DESCALS** y M. HONRUBIA*

RESUMEN. — Catorce sustratos diferentes (hojas inmersas en cursos de agua) se incubaron en agua aireada. Veinte siete taxones anamorfos se detectaron como saprófitos. Se discuten los resultados obtenidos, especialmente aquellos sustratos que se dan como nuevos.

RÉSUMÉ. — En vue d'une étude sur les relations des hyphomycètes aquatiques avec leur substrat, des feuilles d'arbres récoltées dans des ruisseaux du S.E. de l'Espagne ont été incubées au laboratoire dans de l'eau aérée. Quatorze espèces d'Angiospermes ont fourni 27 anamorphes différentes. Les résultats obtenus sont discutés, en particulier ceux concernant les substrats considérés comme nouveaux.

SUMMARY. — In a study on substrate relationships of waterborne hyphomycetes and related fungi, naturally colonized allochthonous decomposing leaves from streams in Southeast Spain, were incubated in aerated water in the laboratory. Fourteen species of angiosperms yielded 27 anamorphs. Results, especially those referring to new substrate records worldwide, are discussed.

MOTS CLÉS : Hyphomycètes aquatiques, saprophytes, sporulation.

INTRODUCCION

Los primeros 'hifomicetos acuáticos' fueron descritos en suelo y sobre algas. INGOLD (1942) describe gran número de especies saprófitos en hojas de *Alnus*. Con posterioridad, los estudios llevados a cabo sobre este grupo de organismos se centran en el aislamiento y cultivo puro de conidios procedentes de muestras de espuma. Por este motivo, en muchos de estos hongos el sustrato es desconocido y, consecuentemente, su papel ecológico en ecosistemas lóticos.

La esporulación de hifomicetos acuáticos en cultivo es un proceso poco estudiado, generalmente se induce por inmersión en agua tancada, pero hay suficientes indicios de que agua corriente (en flujo) es necesaria para una esporulación abundante y típica, al menos en algunas especies (DESCALS & al., 1976).

* Departamento de Botánica. Facultad de Biología. Univ. de Murcia. España.

** Cases Noves, Esporles, Mallorca, Baleares.

WEBSTER & TOWFIK (1972) y WEBSTER (1975) demuestran que la esporulación se ve favorecida cuando se sumerge el sustrato en agua y se le aplica una corriente de aire esterilizado comprimido. Parece que este efecto es similar a las condiciones de turbulencia de los arroyos en que estos hongos se desenvuelven. Otra explicación posible sería que el aumento de la esporulación fuera resultante del incremento de la cantidad de oxígeno disuelta: pero WEBSTER & TOWFIK (1972) sustituye el aire por nitrógeno molecular con idénticos resultados. En el mismo trabajo deduce que el aumento de la esporulación no se puede atribuir al desplazamiento de un inhibidor de naturaleza gaseosa.

Aunque los experimentos de WEBSTER se realizaron con cultivos en medio artificial, el efecto es extrapolable al hongo sobre sustrato natural.

El objectivo del presente artículo ha sido estudiar una amplia gama de restos vegetales, escogidos entre los más característicos del S.E. español: para ello se ha utilizado la metodologia que a continuación se detalla.

MATERIAL Y METODOS

Los restos vegetales se recolectaron en bolsas de plástico, mantenidas a 4-5°C para su mejor conservación. Identificados dichos restos, se lavaron cuidadosamente para eliminar conidios contaminantes. Seguidamente, se dispuso el material en recipientes de cristal y se cubrieron de agua destilada. Se les aplicó una corriente continua de aire, mediante un circuito de tubos alimentados por un compresor.

Después de 48 horas se ha producido abundante esporulación. En las paredes del recipiente suele acumularse espuma, donde quedan atrapados los conidios desprendidos. Si, por el contrario, no se ha producido espuma, se puede inducir su formación aplicando unas gotas de detergente diluido momentos antes de la recolección de las muestras. Estas se disponen sobre portaobjetos, se dejan secar al aire y se tiñen con lactofucsina.

Las distintas experiencias se numeran en la Tabla I, para cada una se indica : tipo de sustrato, localidad de procedencia, naturaleza caliza o silícea del sustrato geológico por el que discurre el curso de agua y fecha de recolección.

TABLA I : Sustratos y localidades
TABLEAU I : Substrats et localités

1. *Salix fragilis* L. Río Hornos (Jaén). WH 24. Calizo. 19-IV-85.
2. *Populus nigra* L. Río Hornos (Jaén). WH 24. Calizo. 19-IV-85.
3. *Salix* sp. Arroyo Endrinales (Albacete). WH 5667. Calizo. 1-V-85.
4. *Populus nigra* L. Arroyo Endrinales (Albacete). WH 5667. Calizo. 1-V-85.
5. *Populus nigra* L. Arroyo Barbezoso (Albacete). WH 27. Silíceo. 30-IV-85.
6. *Crataegus monogyna* Jacq. Arroyo del Membrillo (Jaén). WH 1210. Calizo. 19-VII-85.
7. *Populus nigra* L. Río Mundo (Albacete). XH 0458. Calizo. 18-VII-85.
8. *Salix eleagnos* Scop. Río Mundo (Albacete). WH 6660. Calizo. 18-VII-85.
9. *Juglans regia* L. Río Taibilla (Albacete). WH 5738. Calizo. 28-VIII-85.

10. *Populus alba* L. Río Vinalopó (Alicante). YH 0287. Calizo. 9-XI-85.
11. *Populus nigra* L. Río de Agres (Alicante). YH 2396. Calizo. 9-XI-85.
12. *Populus euphratica* Olivier Río Vinalopó (Alicante). YH 0140. Calizo. 9-XI-85.
13. *Acer monspessulanum* L. Los Chorros (Albacete). WH 45. Calizo. 16-XI-85.
14. *Fraxinus angustifolia* Vahl. Los Chorros (Albacete). WH 45. Calizo. 16-XI-85.
15. *Crataegus monogyna* Jacq. Los Chorros (Albacete). WH 45. Calizo. 16-XI-85.
16. *Salix fragilis* L. Los Chorros (Albacete). WH 45. Calizo. 16-XI-85.
17. *Populus nigra* L. Arroyo Berruga (Almería). WG 3619. Silíceo. 5-X-85.
18. *Populus nigra* L. Río Chico (Granada). VF6284. Silíceo. 1-I-86.
19. *Robinia pseudoacacia* L. Río Chico (Granada). VF 6284. Silíceo. 1-I-86.
20. *Salix atrocinerea* Brot. Río Chico (Granada). VF 6284. Silíceo. 1-I-86.
21. *Quercus pyrenaica* Willd. Río Poqueira (Granada). VF 6788. Silíceo. 1-I-86.
22. *Juncus* sp. Barranco Hornillo (Almería). VG 9705. Silíceo. 1-I-86.

DISCUSION

Los resultados se resumen en la Tabla II, donde se relacionan las distintas especies de hifomicetos acuáticos con sus correspondientes sustratos vegetales y geológicos.

WEBSTER & DESCALS (1981) relacionan los hifomicetos acuáticos descritos hasta la fecha respecto de los sustratos donde habían sido detectados.

En el presente artículo se amplían los datos sobre la ecología de algunas especies. Así, *Alatospora pulchella*, que sólo se conocía sobre helechos, se cita por primera vez sobre hojas de *P. nigra* y tallos de *Juncus* sp.

Lemonniera pseudofloscula ha sido encontrada sobre hojas de *P. nigra* y *L. terrestris* sobre hojas de *S. atrocinerea*, *R. pseudoacacia*, *Q. pyrenaica* y tallos de *Juncus* sp., lo que supone nuevos sustratos para estos hongos. Cabe resaltar igualmente la versatilidad ecológica de *Mycocentrospora acerina*, que puede constituirse en un peligroso parásito humano (DEIGHTON & MULDER, 1977) y que ha sido hallado sobre hojas de *Q. pyrenaica*.

Volucrispora ornithomorpha no es recopilada por WEBSTER & DESCALS (1981) ya que puede tener un hábito de vida terrestre; en el estudio aquí realizado, se ha observado colonizando hojas sumergidas de *R. pseudoacacia*.

Tetracladium apiense, descrito por SINCLAIR & EICKER (1981), sobre hojas no identificadas, se cita por primera vez sobre *R. pseudoacacia* y *S. atrocinerea*. *Leptocladia neglecta* es una especie de reciente descripción (MARVANOVA & DESCALS, 1985), conocida hasta ahora sólo por la presencia de sus conidios en espumas de arroyos. En la Tabla II se indican tres sustratos para este hongo.

Los resultados obtenidos no pueden ser interpretados de manera definitiva; las diferentes experiencias se realizaron a temperatura de laboratorio (16-24°C). Quizás, con un mayor control de las condiciones ambientales, la lista de especies detectadas se habría visto aumentada, especialmente en los experimentos realizados durante el verano, cuando la temperatura de laboratorio y la propia del

TABLA II

Respuesta de la esporulacion *in vitro* de 'hifomicetos acuaticos' a la especie vegetal del sustrato. (Los números corresponden ■ localidades citadas ■ la Tabla I)

TABLEAU II

Réponse de la sporulation *in vitro* d'hyphomycètes aquatiques selon l'espèce végétale du substrat. (les numéros correspondent aux localités citées dans le Tableau I).

	Juncus sp.	*Quercus pyrenaica*	*Robinia pseudoacacia*	*Salix atrocinerea*	*Populus nigra*		*Acer monspessulanum*	*Crataegus monogyna*	*Fraxinus angustifolia*	*Juglans regia*	*Populus alba*	*Salix eleagnos*	*Salix fragilis*	*Salix* sp.	*Populus euphratica*	Nº Total de sustratos por especie
	SUSTRATOS GEOLOGICOS ORIGINARIOS															
	ACIDOS					BASICOS									SALINOS	
Alatospora flagellata (Gönczöl) Marv.						2										1
A. pulchella Marv.	22					2										2
Anguillospora longissima (Sacc. & Sydow) Ingold					5, 18	2				9	10					3
Heliscus lugdunensis Sacc. & Therry	22		19	20	18	7	13		14		10		16			8
Lunulospora curvula Ingold				20	18								16			3
Tetracladium marchalianum de Wild.		21	19		17, 18	2, 4	13	6, 15	14	9	10		1, 16	3		10
Tricladium angulatum Ingold			19	20		4				9			1	3		6
Alatospora acuminata s. l. Ingold						2, 4	13	15					1, 16	3		5
Lemonniera aquatica de Wild.													1			1
Leptocladia neglecta Marv. & Descals								15					16	3		3
Tetracladium setigerum (Grove) Ingold						4										1
Chaetospermum chaetosporium (Pat.) Smith ■ Rambsbottom (celomiceto)						7										1
Alatospora acuminata s. str. Ingold		21	19	20	18											4
Articulospora tetracladia Ingold	22	21	19	20												4
Flagellospora curvula Ingold		21														1
Lemonniera cornuta Ranzoni		21	19	20												3
L. pseudofloscula Dyko						17										1
L. terrestris Tubaki	22	21	19	20												4
Mycocentrospora acerina (Hartig) Deighton		21														1
Tetrachaetum elegans Ingold		21														1
Tetracladium apiense Sinclair & Eicker			19	20												2
Tricellula aquatica Webster			19													1
Tricladium giganteum Iqbal	22															1
T. splendens Ingold	22			20												2
Volucrispora ornithomorpha (Trotter) Haskins			19													1
Alternaria alternana (Fr.) Keissler															12	1
Fusarium aquaeductum (Radlk & Rabh.) Lagesh.															12	1
Nº total de especies por sustrato	6	8	10	9	5	10	3	3	2	3	3	0	7	4	2	
					12											

agua fluvial pueden diferir en más de 10°C. De alguna manera, se podría interpretar que las especies manifestadas presentan unas características esporuladoras de amplio espectro térmico, poco sensibles a cambios de temperatura.

Respecto de las exigencias de sustrato, *Tetracladium marchalianum* (10 sustratos diferentes), *Heliscus lugdunensis* (8), *Alatospora acuminata* (8) y *Tricladium angulatum* (6) han resultado ser los de mayor capacidad de colonización. Estos datos eran previsibles, por cuanto tales especies son las más ampliamente citadas en la bibliografía. Ahora bien, las referencias bibliográficas aluden casi exclusivamente a su presencia en aguas silíceas, mientras que la mayoría de las muestras aquí examinadas proceden de arroyos calizos.

Por otra parte, también se han manifestado especies en forma esporádica : *Alatospora flagellata*, *Chaetospermum chaetosporium*, *Mycocentrospora acerina* y *Volucrispora ornithomorpha*, lo cual coincide con las escasas referencias habidas de ellas. En otros casos, como *Tricladium giganteum*, su limitada presencia es imputable a su demostrada especificidad sobre un sustrato determinado, en este caso restos de *Juncus* sp.; o, como en *Tricladium splendens* y *Tetrachaetum elegans*, por su exclusiva presencia en zonas silíceas. Hay sustratos sobre los que no se ha encontrado ninguna especie, como en *S. eleagnos*, probablemente porque el material no tuvo tiempo de ser colonizado en el cauce. El caso de *P. euphratica* es especial: sobre él han aparecido *Alternaria alternata* y *Fusarium aquaeductuum*, dos hifomicetos no considerados dentro del grupo. La ausencia de 'hifomicetos acuáticos', puede deberse a la elevada concentración en sales de las aguas; si bien esta especie de chopo sólo se desarrolla bajo tales condiciones, por lo que es posible que en el papel de descomponedores de sus hojas, se han visto relegados los 'hifomicetos acuáticos' por otras especies, normalmente ligados al medio terrestre. Otros sustratos, en cambio, aparecen como más favorables para el desarrollo de una micoflora diversa. *P. nigra*, con hasta 12 colonizadores, aparece como el sustrato que mayor número de especies soporta. Esto es explicable, en cierto modo, por tratarse del más extendido y estudiado, dadas las vastas repoblaciones existentes a lo largo de los cursos de agua de la zona. Algo similar ocurre con *S. fragilis*, con 7 hifomicetos detectados.

S. atrocinerea y *Q. pyrenaica* aparecen citados en la bibliografía (WEBSTER & DESCALS, 1981) como muy buenos sustratos; lo que coincide con lo expresado en la tabla II, cuyos datos han sido obtenidos a partir de una sola recolecta y, en el caso de *Q. pyrenaica*, de una sola hoja.

A pesar del importante número de anamorfos detectados (27 en total), en espumas naturales de la zona se han reconocido más de 60 (ROLDAN & al., a - b, en prensa). Esto parece demostrar la falta de conocimiento existente sobre el hábito de vida de estos hongos, incluyendo sus sustratos naturales. Estudios detallados sobre el tema se plantean, pues, como necesarios.

REFERENCIAS

DEIGHTON F.C. and MULDER J.L., 1977 - *Mycocentrospora acerina* as a human pathogen. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 69 : 326-327.

DESCALS E., NAWAWI A. and WEBSTER J., 1976 — Developmental studies on *Actinospora* and three similar aquatic hyphomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 67 : 207-222.

INGOLD C.T., 1942 — Aquatic hyphomycetes of decaying older leaves. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 25 : 339-417.

MARVANOVA L. and DESCALS E., 1985 — New and critical taxa of aquatic hyphomycetes. *Bot. J. Linn. Soc.* 91 : 1-23.

ROLDAN A., DESCALS E. y HONRUBÍA M., [illegible] — Hifomicetos acuáticos en las cuencas altas de los ríos Segura y Guadalquivir. *Anales Biol. Univ. Murcia* (en prensa).

ROLDAN A., DESCALS E. y HONRUBIA M., b — Hifomicetos acuáticos en Sierra Nevada. *Acta Bot. Malacitana* (en prensa).

SINCLAIR R.C. and EICKER A., 1981 — *Tetracladium apiense*, a new aquatic species from South Africa. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 76 : 515-517.

WEBSTER J. and TOWFIK F.H., 1972 — Sporulation of aquatic hyphomycetes in relation to aeration. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 59 : 353-364.

WEBSTER J., 1975 — Further studies of sporulation of aquatic hyphomycetes in relation to aeration. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 64 : 119-127.

WEBSTER J. and DESCALS E., 1981 — Morphology, distribution and ecology of conidial fungi in freshwater habitats. *In* : COLE G.T. and KENDRICK B., *The Biology of Conidial Fungi.* New York, Academic Press : 295-355.

ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

HOWARD D.H., 1983, 1985 — Fungi pathogenic for human and animals (in three parts). Part B. Pathogenicity and detection I and II. New York & Basel, M. Dekker Inc. 543 p., 381 p.

Ces deux tomes font partie d'une série mycologique qui sera constituée de six volumes. En fait, seul le «volume» 3, qui comprend trois tomes notés respectivement d'une façon qui n'est pas idéale : Part A, Part B-I et Part B-II, est consacré à la mycologie médicale. Ces deux tomes regroupent en fait des questions occupant soit une place centrale prédominante en mycologie médicale soit une position marginale comme le montre bien la liste des thèmes traités. La partie B. Pathogénicité et détection - I (sous entendu des champignons dans l'organisme-hôte) comprend les chapitres suivants : 1) les mécanismes du pouvoir pathogène, 2) les cellules intervenant dans les mécanismes de défense, 3) les réponses humorales, 4) le sérodiagnostic, 5) l'utilisation des antigènes dans l'évaluation de la réaction immunitaire, 6) la détection des antigènes circulants, 7) le mode d'action des antifongiques, 8) la mesure de l'activité des antifongiques, 9) les champignons toxiques, 10) les mycotoxines et les mycotoxicoses. La partie B. Pathogénicité et détection - II comprend : 1) la nutrition, la physiologie et le métabolisme des champignons pathogènes, 2) la composition des parois, 3) les particules cellulaires (par exemple : les virus), 4) l'importance de la phagocytose dans les réponses de l'hôte, 5) la conservation, les collections et la distribution des souches, 6) l'épidémiologie des mycoses, 7) la détection des champignons dans les tissus, 8) les techniques habituelles de cultures et de détection des champignons pathogènes pour l'homme, 9) les vaccins fongiques, 10) la taxonomie du genre *Exophiala*.

En fait, les sujets exposés peuvent être répartis en deux ensembles : le premier comprend des thèmes d'actualité, le deuxième des thèmes classiques dont l'intérêt réside surtout dans leur présentation.

Le premier ensemble est essentiellement constitué des chapitres consacrés à l'immunologie, comme les mécanismes du pouvoir pathogène, les réponses humorales, la phagocytose, la détection des antigènes circulants. Ces différents problèmes font l'objet de travaux dans différents laboratoires et nos connaissances encore bien incomplètes devraient se développer rapidement au cours des années à venir. Il apparaît déjà très nettement qu'il existe plusieurs variantes dans les mécanismes de défenses et que ceux-ci sont impliqués différemment selon le type d'infection. Les altérations de l'une d'entre elles favorisent donc une mycose ou un groupe de mycoses en particulier. La détection des antigènes circulants selon différentes techniques biochimiques constitue un sujet important aussi bien en parasitologie qu'en mycologie. Les caractérisation des antigènes ou de métabolites spécifiques d'une espèce devrait constituer une méthode de choix dans le diagnostic des mycoses profondes.

Le deuxième ensemble comprend divers chapitres comme l'épidémiologie des mycoses ou la détection des champignons dans les tissus. Dans ce dernier cas, à côté de quelques techniques originales, on trouve des colorations de routine exposées depuis de nombreuses années dans les manuels de mycologie.

Quelque soit l'originalité des sujets traités, l'existence de plans placés en tête de chaque chapitre, la division en paragraphes bien individualisés permet une lecture facile et montre d'emblée les éléments primordiaux. Chaque chapitre par ailleurs est accompagné d'une bibliographie généralement importante.

En conclusion, ces ouvrages ne sont pas à considérer comme l'équivalent de traités de mycologie médicale - on devra rechercher dans ceux-ci les éléments de base – mais ils fourniront aux chercheurs et aux enseignants de très nombreuses informations sous une forme facile à consulter.

C. de Bièvre

CASSELTON L.A., WOOD D.A. and FRANKLAND J.C., 1985 – Developmental biology of higher fungi (British Mycological Society Symposium 10, Manchester Avril 1984). Cambridge, Cambridge University Press, 615 p.

Dans le courant des deux dernières décennies, plusieurs ouvrages collectifs ont traité de divers aspects de la physiologie du développement des champignons considérés dans leur ensemble. Dans la plupart d'entre eux, un chapitre est consacré aux macromycètes, ceux-ci pouvant également faire l'objet d'analyses comparatives (ex : physiologie comparée de la croissance ou de la reproduction de micromycètes et de macromycètes du point de vue de divers facteurs : facteurs nutritionnels, température, lumière...). En dépit de l'intérêt indéniable de ces ouvrages, il est apparu utile, au cours des dernières années, d'établir des mises au point plus spécialisées, consacrées aux seuls macromycètes. Cette nouvelle approche est complémentaire des précédentes : il serait imprudent de considérer comme indépendantes les recherches consacrées au développement des macromycètes et celles portant sur le développement des micromycètes... et des autres organismes – végétaux... sinon animaux.

Les ouvrages évoqués viennent d'être complétés utilement par la publication de «Developmental biology of higher fungi» où chaque chapitre a été rédigé par un ou plusieurs spécialistes. Comme à l'accoutumé pour ce type d'ouvrage, le lecteur ne devra pas s'attendre à trouver cohésion et harmonie parfaites entre les chapitres du livre, rédigés en toute indépendance par des auteurs soucieux de développer un thème propre. Dans ces conditions, un hommage peut leur être rendu, ainsi qu'aux «éditeurs» : il n'y a pratiquement pas de redites importantes apparaissant à la lecture de chapitres successifs.

Les 6 premiers chapitres relèvent de l'écophysiologie des champignons supérieurs (un chapitre est consacré aux agaricales tropicales), de la phytopathologie (un chapitre est consacré aux *Armillaria*) et des interactions champignons-végétaux supérieurs (un chapitre sur la dynamique de la mycorhization en liaison avec le développement forestier).

Les 5 chapitres suivants correspondent plus directement à l'intitulé de l'ouvrage. Ils traitent d'aspects cytologiques et histologiques. On notera en particulier un chapitre sur «la formation du dicaryon» et un autre sur «les caractéristiques du développement des agaricales». Ces deux mises au point pourront être consultées utilement par les chercheurs ayant éventuellement quelques «trous de mémoire» en matière de sexualité des basidiomycètes ou en matière de développement d'agaricales.

Les 8 chapitres qui suivent traitent de la physiologie des carpophores depuis la différenciation des primordiums jusqu'à la formation des basidiospores. en passant par l'étude de l'élongation des stipes et la formation des différentes parties constitutives des chapeaux. Deux chapitres sont consacrés à une approche fondamentale de la physiologie de champignons comestibles : l'un traite de la biochimie de la fructification du champignon de couche, l'autre de la fructification sur milieu défini du Shiitake (*Lentinus edodes*). L'utilité de ces chapitres spécialisés pourrait échapper. Il paraît donc opportun de souligner ici que, pour des raisons techniques diverses, les champignons comestibles en général ont été jusqu'à présent relativement peu étudiés, dans la mesure où leur fructification *in vitro* reste problématique et l'étude de leur physiologie *in situ* aléatoire. D'où l'intérêt général certain des 2 chapitres évoqués.

Ensuite, 4 chapitres ouvrent diverses perspectives d'avenir prometteuses sur l'approche du développement des champignons supérieurs via les techniques modernes de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire. On notera les résultats obtenus dans le cas de *Schizophyllum commune* où les relations établies entre gènes, ARNm et des polypeptides majeurs, et diveres étapes de la morphogenèse des carpophores, laissent bien augurer de progrès rapides en la matière. Des travaux similaires devraient se développer concernant les coprins. Dans le cas de ces derniers, on notera une meilleure approche des problèmes de recombinaison génétique par le biais de recherches approfondies sur la méiose. Un chapitre aborde utiliment le problème de la définition d'une stratégie en vue de la sélection d'espèces comestibles. Les chercheurs fondamentalistes pourront y juger des problèmes concrets posés aux généticiens qui se préoccupent effectivement de déboucher sur l'application.

En suite logique, 2 chapitres concernant directement l'application sont consacrés aux problèmes spécifiques posés par la biologie et la technologie du champignon de couche (compostages...). Enfin, un avant-dernier chapitre énumère divers métabolites secondaires produits par des agaricales. Leurs rôles et intérêts pratiques éventuels sont discutés.

Le 27ème et dernier chapitre esquisse, avec une prudence légitime, une «synthèse» sur l'état actuel des connaissances relatives à la biologie du développement des agaricales. Ce chapitre présente l'originalité d'avoir été co-rédigé par A.F.M. REIJNDERS – qui compte parmi les rares spécialistes de la cyto-histologie du développement des carpophores d'agaricales – et D. MOORE, spécialiste de la physiologie du développement des coprins. Leur texte a le mérite de souligner que les champignons supérieurs constituent, de longue date, un excellent modèle d'étude de la biologie générale du développement. En effet.

l'étude de leurs carpophores laisse quelques espoirs de parvenir à «démonter» certains mécanismes intervenant au cours de diverses étapes de leur différenciation (ex : induction de la phase végétative, différenciation des hyméniums au sein des primordiums, évolution des hyméniums : méiose, sporogenèse...). La formation des carpophores offre certainement «... un système accessible pour l'étude de la génétique et des bases moléculaires d'un développement multicellulaire...» (J.G.H. WESSELS in *Molecular genetics of filamentous fungi*, p. 193. Alan R. LISS Inc.). Encore conviendrait-il que dans le futur, les approches génétiques, physiologiques, cytologiques et histologiques soient conduites non plus séparément mais de manières plus coordonnées et intégrées. Les auteurs des 27 chapitres évoqués ... et leurs collaborateurs actuels et futurs sauront-ils – ou pourront-ils – évoluer dans ce sens ?

G. Manachère

GIANINAZZI-PEARSON V. and GIANINAZZI S., 1986 — Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes. (Actes du 1er Symposium Européen sur les Mycorhizes, Dijon 1-5 juillet 1985). Paris, INRA, 832 p.

Les progrès des recherches en matière de mycorhizes sont impressionnants, et la France joue un rôle de choix.

A la faveur du Symposium de Dijon ont été surtout évoqués les travaux en relation avec les thèmes suivants : Infection et intercations cellulaires; Physiologie de la nutrition; Taxonomie et Génétique.

En sus, une formule très élégante, sous la forme de 113 «communications aux ateliers» (brèves notes recouvrant une multitude d'approches) a préparé une table ronde finale animée par le très réputé Prof. HARLEY.

Il n'est guère d'espèce prairiale, forestière, légumière ou horticole, qui ne fasse l'objet de recherches poussées en matière de mycorhizes. Ce qui ressort du volume remarquable (à la présentation impeccable) c'est que, grâce à la microscopie électronique, à l'approche biochimique, aux progrès de la microbiologie appliquée, et surtout à la sagacité sans limite des chercheurs, les complexes mycorhiziens sont sans cesse mieux «démontés» et, tour à tour : la reconnaissance réciproque des partenaires, la constitution des unions (avec approche ultrastructurale), leur fonctionnement intime (flux de carbone, de phosphore, d'azote...), le choix des meilleurs associés fongiques (en vue d'applications), les stress subis sous l'influence de polluants atmosphériques ou des sols sinon de pesticides ou d'adversités climatiques, l'inhibition des pathogènes potentiels par le partenaire fongique, tout cela fait l'objet de communications de très grande valeur.

Aux informations regroupées dans ce gros volume on peut à coup sûr juxtaposer des applications dans tous les domaines : agriculture, sylviculture, horticulture, qui savaient pourtant déjà tirer parti des «associations mycorhiziennes».

Voici un ouvrage qui «fait le point», que tout passionné de mycorhizes aussi bien que tout praticien éclairé, devra se procurer... en attendant le prochain

volume rendant compte du futur Symposium de Prague... en 1988 !

B. Boullard

COOKE W.B., 1985 – The fungi of our mouldy earth. (A compilation). Beihefte zur Nova Hedwigia - Heft 85. J. Cramer ed. 467 p.

W.B. COOKE propose ici un inventaire actualisé des champignons filamenteux et des levures rencontrés dans les eaux résiduaires, les eaux polluées, les champs d'épandages ou autres systèmes de traitement des eaux résiduaires.

Il rapporte les résultats des analyses effectuées par son équipe et les données trouvées dans la littérature.

Dans la première partie, il expose les techniques de récolte, les principaux milieux de culture pour l'isolement et l'identification ainsi que la description (sommaire) de la cinquantaine d'habitats où ont eu lieu les prélèvements.

Vient ensuite la classification des champignons rencontrés par ordre systématique de classes, ordres, familles, genres et espèces avec clés d'identification (90 pages). Chaque espèce est ensuite reprise, toujours dans l'ordre systématique, accompagnée du nom du récolteur, des lieux de récolte, de la fréquence d'isolement et d'un qualificatif (lymabionte, lymaphile, lymaxène et lymaphobe) indiquant la faculté du champignon de se développer exclusivement, facultativement, temporairement ou jamais dans les milieux étudiés.

Cet exposé constitue la partie la plus importante de l'ouvrage.

On trouve ensuite un glossaire, une liste bibliographique de 193 références ainsi que 114 figures au trait, originales ou reprises dans des publications antérieures.

Deux tableaux récapitulatifs complètent enfin cet ouvrage : l'un reprend les habitats et le nombre d'espèces rencontrées dans chacun d'eux et l'autre les espèces et leur fréquence d'isolement par habitat.

L'ensemble constitue un ouvrage de compilation d'un volume et d'un intérêt considérable même si l'on regrette un peu le faible nombre de données d'ordre biologique et l'absence de tentative de synthèse des résultats.

M. F. Roquebert

SINGER R., 1986 – The Agaricales in modern Taxonomy, 4e édition, Kœnigstein (R.F.A.), Koeltz Scientific Books, 981 pages, 88 planches dont 2 en couleurs.

La quatrième édition de ce volumineux ouvrage, véritable Somme bien connue de tous les mycologues, et l'un des plus importants ouvrages mycologiques parus en ce siècle, présente les mêmes qualités et le même intérêt que les précédentes, en ce sens que ce Traité est le seul à s'appliquer non seulement à la flore européenne et nord-américaine, mais à celle de toute la planète; de plus il assigne une place précise à la presque totalité des espèces ou groupes d'espèces actuellement connues. Ce résultat n'a pu être obtenu que par la connaissance approfondie qu'a l'auteur de toute la littérature parue sur le sujet avant l'avène-

ment du microscope électronique et de la chimiotaxinomie, ainsi que par les séjours qu'il a faits dans de nombreuses régions des deux Amériques, et même jusque dans les montagnes de l'Asie soviétique, Caucase, mont Altaï. On trouve donc, dans ce livre, une mine inépuisable de renseignements de tous ordres.

Le livre s'ouvre par des compléments sur les Généralités qui figuraient dans les anciennes éditions, car l'Auteur ne pouvait pas ne pas mentionner les découvertes récentes ayant une incidence sur la taxinomie. On trouve donc successivement les rubriques suivantes : couleur des sporées, mycéliums (notamment sur leur obtention en culture pure; rhizomorphes, sclérotes, mycorhizes), lichénisation des carpophores, formations plus ou moins tératologiques, gastéromycétation, cyphelisation, tuberisation, arthrosporocarpes et carpophores synnematoïdes, embryologie, voiles (par Reijnders), structures des carpophores, hyménium, tissus stériles, revêtements, spores, structures fines de leur paroi (cette partie, très brève, par H. Clémençon), macroréactifs et analyse chimique, caractères physiques, chorologie et écologie, théories phylogénétiques, définition des taxa. En tout, 148 pages qui constituent la partie la plus nouvelle et la plus intéressante de cette édition, car la classification adoptée n'a que peu varié par rapport à la troisième.

Plusieurs taxa supragénériques ont été créés : dans les Tricholomacées, la tribu des Termitomycètes pour *Termitomyces* et *Podabrella*, et la tribu des Tricholomatées qui a été divisée en 4 sous-tribus : Laccariinées, Clitocybinées, Tricholomatinées et Omphalinées.

Les *Inocybe* ont été isolés dans la tribu des Inocybées Fayod, ce qui est conforme à notre opinion. Dans les Boletacées, les *Gyroporus* constituent la sous-famille des Gyroporoidées et les *Strobilomyces*, sont isolés dans la sous-famille des Strobilomycetoidées. Les familles de Bondarzewiacées et des Russulacées sont réunies dans le sous-ordre des Russulinées.

Plusieurs genres ont été admis ou débaptisés : *Fissolimbus* (Omphalinées), *Pegleromyces, Mycoalvimia* (Mycénées), *Callistodermatium* (Pseudohiatulées), *Sericeomyces, Janauaria* (Lépiotées), *Horakia* à la place de *Verrucospora* (Cystodermatées). Certains, dont la position taxinomique était en 1975 considérée comme incertaine ont été insérés dans la classification : *Boletochaete* a été placé dans les Boletoidées, ainsi que *Fistulinella* et *Austroboletus; Merismodes* en a été exclu, comme de position incertaine.

D'autres ont changé de position : *Hypsizygus* a été versé dans les Lyophyllées, vraisemblablement avec raison, *Pseudoconocybe* a été intégré aux *Conocybe*, *Cuphocybe* a trouvé sa vraie place dans les Cortinariées, cette même famille accueillant aussi les *Lampteromyces*, et *Velomycena* est tombé en synonymie de *Galerina*; enfin, *Phyllobolites* a été placé dans les Paxillacées.

Ces modifications, comme on le voit peu nombreuses, semblent pour la plupart heureuses; c'est également le cas de l'exclusion de *Lentinellus* des Leucopaxillées.

Cependant, on regrette que l'auteur ne soit pas allé beaucoup plus loin. La critique majeure que l'on pouvait faire à sa classification de 1975 était de n'avoir pas tenu compte des données nouvelles apportées à la mycologie systé-

matique par la microscopie électronique à transmission, qui a permis de mieux connaître l'ultra-structure des parois sporiques, et par la chimiotaxinomie, en particulier l'analyse des pigments, qui ont révélé des affinités inattendues entre les taxa antérieurement admis. De plus, les critiques, dont beaucoup sont pourtant très pertinentes, que son système a suscitées, et qu'on pouvait s'attendre à voir discuter, ne serait-ce que pour les réfuter, ont été passées sous silence ou trop brièvement mentionnées. Ces critiques, dont beaucoup émanent de l'école française, étaient pourtant développées ou reprises dans l'œuvre monumentale de R. Kühner «Les Hyménomycètes agaricoïdes» parue à Lyon en 1980, et qui, tout autant que celle de Singer, marquera une date dans l'histoire de la Systématique du XXème siècle. Or, six ans après, cet ouvrage capital n'est même pas cité dans la Bibliographie générale (on y trouve seulement les références des articles préliminaires publiés dans le Bulletin mensuel de la Société linnéenne de de Lyon avant cette date); la mention n'en est faite qu'incidemment, sous la plume de H. Clémençon, dans les quelques pages rédigées par celui-ci sur les ultrastructures de la paroi sporale. Nous ne nous expliquons pas cette énorme lacune. L'auteur aurait-il renoncé à en tenir compte à cause des bouleversements que cela eût apportés à son Système ?

Il est en effet resté sur ses positions à propos de la plupart des points importants, même les plus judicieusement contestés : il persiste par exemple à regarder les Agarics comme dérivés des Gastéromycètes, bien que la complexité de la structure des parois sporales et l'absence de boucles de la plupart d'entre eux dénoncent un degré d'évolution très poussé, dans le sens régressif pour le carpophore. Les Cystodermées sont maintenus dans les Agaricacées (= Lepiotacées) et il place la *Lepiota echinata* à côté des Psalliotes, alors que diverses raisons, très solides (spores, sous-hyménium filamenteux) rattachent clairement les premières aux Tricholomacées, et que les pigments sporaux de la deuxième n'ont rien de commun avec ceux des Psalliotes. Les *Panaeolus* sont maintenus dans les Coprinacées, alors que des chrysocystides très typiques se rencontrent chez plusieurs espèces, ce qui dénonce de toute évidence une étroite parenté avec les Strophaires et que là aussi le pigment sporal est chimiquement différent par sa résistance à l'acide sulfurique. Les Pluteacées sont rapprochés des Amanitacées, malgré la structure très différente de la paroi des spores, qui la rapproche des Entolomacées, exactement comme pour le *Macrocystidia*, qui n'a rien à voir avec les Tricholomacées. Kühner a démontré que la conception de Singer des Crepidotacées ne pouvait être acceptée dans l'extension qu'il lui accorde, ses *Simocybe* (gr. *centunculus*) étant en réalité très voisins des *Agrocybe*, et ses *Phaeomarasmius* (sauf le type) qu'il range dans les Cortinariacées, ne pouvant être éloignés des *Tubaria*, autre composant de ses Crepidotacées. De même, les *Ripartites* ne sauraient être, comme il le pense, des Paxillacées à cause de leurs verrues sporales cyanophiles et de leurs hyphes binucléées, caractères qui conduisent à les rapporter aux *Lepista*, solution que Singer lui-même avait adoptée (avec raison) dans l'édition de 1962.

Un autre point, sur lequel la discussion reste ouverte et toutes les opinions sont permises, mérite d'être abordé : celui des relations entre les champignons charnus à lamelles et certaines Aphyllophorales.

Plusieurs espèces, classiquement considérées comme des «Agarics» sont évidemment proches de ces dernières. C'est évident pour le *Lentinus degener*, qui est un Polypore à lames par sa consistance et la composition de la trame; on le trouve même attaqué par certains Coléoptères propres aux Polyporacées. Sans doute existe-t-il d'autres espèces dans ce cas. Mais doit-on, comme le fait Singer, transférer la totalité des Polypores plus ou moins charnus dans les Agarics ? Nous croyons au contraire qu'il y a quelque inconvénient à laisser *L. degerer* et autres au sein des Agaricinées; mais on peut très bien être d'un avis contraire.

Le genre *Polyporus* tel que le conçoivent la plupart des spécialistes modernes, aussi bien que Singer, réunit en raison de la constitution de leur trame, les anciens *Melanopus* du groupe *squamosus*, dont la consistance charnue et tendre en fait des espèces comestibles, les *Melanopus* du groupe *varius* et les anciens *Leucoporus (= Polyporellus)*, tous trop coriaces pour être consommables. Cette cohabitation nous semble contestable. Quoi qu'il en soit, mettre les *Leucoporus* dans la même famille que *Pleurotus ostreatus* et *cornucopiae* nous paraît choquant, et nous préférons avec Kühner rejeter ces Polypores des Agaricinées pour les laisser dans les Aphyllophorales, mais en même temps placer au sein de ces dernières certains *Lentinus* comme *degener*.

Quant aux Bondarzewiacées, leur ornementation sporale tout à fait analogue à celle des Lactario-russulés et la présence de sulfocystides, ainsi que la saveur âcre, nous conduisent à abandonner notre ancienne opinion et à admettre une parenté de ce Polypore avec ces derniers; parenté certainement lointaine, et à un point tel que nous croyons préférable de laisser aussi cette famille dans les Aphyllophorales : en effet ses caractères macroscopiques, sa biologie et l'absence de tissu hétéromère l'éloignent beaucoup des Russulacées, sans que cela n'implique l'absence de tout lien de parenté entre ces taxa.

Les *Lentinellus* posent un problème analogue. Nous en profiterons pour rappeler à notre confrère américain que ce n'est pas Maas Gesteranus qui, le premier, a révélé les caractères microscopiques communs entre ceux-ci et les Auriscalpiacées (spores subglobuleuses, amyloïdes; laticifères et pseudocystides Sulfo +); cet auteur a seulement apporté un argument de plus à notre manière de voir : la structure de la marge piléique. C'est nous même qui l'avons démontré en 1953 (*Bull. Soc. Nat. Oyonnax*, 7 : 111). Et c'est aussi nous qui avons souligné les analogies de tous ordres existant entre les *Lentinellus* et les *Lactarius*, d'abord dans un article paru en 1961 dans la Revue française «Science et Nature» (47, n° de sept.-oct.) ensuite dans notre Monographie des Russules (1967) où cette opinion a été longuement expliquée.

Cette rectification faite, la même raison que ci-dessus nous fait préférer le maintien des Auriscalpiacées dans les Aphyllophorales – et, à notre avis, dans un même taxon que les Hériciacées : bien que le système laticifère de ceux-ci ne noircisse pas en milieu sulfoaldéhydique, il présente le même comportement que l'*Auriscalpium* vis-à-vis des colorants des lipides, et l'on sait qu'il existe des Lactario-russulés qui sont dans le même cas que les *Hericium*.

Sur un plan pratique, concernant l'utilisation de ce livre, on regrettera que la Table de noms d'espèces ne comporte que ceux figurant dans la partie générale.

et qu'on soit ainsi obligé de se référer, pour les autres, à la troisième édition aujourd'hui épuisée.

Ces critiques n'empêchent naturellement pas l'ouvrage du Dr Singer de constituer une étape essentielle dans l'histoire de la mycologie et de demeurer à jamais un de ses classiques. Nous regrettons seulement qu'il soit déjà en plusieurs points quelque peu dépassé. Pouvons-nous espérer une cinquième édition ?

H. Romagnesi

Source : MNHN, Paris

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

Les articles proposés dans *Cryptogamie-Mycologie* doivent être rédigés en un style clair et concis. Outre la langue française, la revue accepte les articles rédigés en langue anglaise, allemande, espagnole.

Chaque article proposé pour publication devra comporter :

– un titre en français et en anglais.

– un titre courant bref, pouvant contenir dans le haut de page (soit 8 cm maximum).

– des mots-clés qui seront sélectionnés par le Comité de Lecture.

– un résumé en français et en anglais (150 mots maximum), pour les articles rédigés en français. Un résumé dans la langue originale et un résumé en français plus développé (300 mots environ), pour les articles rédigés en langue étrangère.

– les noms et prénoms des auteurs, et leurs adresses.

– le plan de l'article indiquant clairement la hiérarchie des titres.

Le manuscrit sera dactylographié en double interligne, au recto exclusivement. Seuls les mots destinés à être en italiques seront soulignés. Les références bibliographiques dans le texte seront indiquées par le nom d'auteur en capitales non soulignées, sans les initiales des prénoms (sauf dans le cas où plusieurs auteurs portent le même nom), suivi de l'année de publication. Lorsque l'article est signé par plus de deux auteurs, il est admis de ne citer que le premier, suivi de «et al.». Les références bibliographiques citées par des numéros ne sont pas acceptées.

Chaque page, y compris la bibliographie, doit être numérotée à la suite. Les figures, tableaux et planches photographiques seront fournis sur feuilles séparées, après le texte. Les légendes doivent être rédigées en français et en anglais (ou en langue originale dans le cas d'articles en allemand ou en espagnol).

Les auteurs devront envoyer leur manuscrit dactylographié en trois exemplaires.

BIBLIOGRAPHIE

Elle est présentée à la suite du texte, dans l'ordre alphabétique, et, pour chaque auteur, selon l'ordre chronologique.

Pour les abréviations de périodiques, les auteurs pourront se référer au «Botanico Periodicum Huntianum» 1968, Pittsburg, U.S.A.

Les références seront complètes, et suivront les modèles suivants :

– dans le cas d'un article tiré d'un périodique :

PATOUILLARD N., 1881 – Sur l'appareil conidial de *Pleurotus ostreatus*. *Bull. Soc. Bot. France* 27 : 125.

– dans le cas d'une citation extraite d'un ouvrage :

HEIM R., 1957 – *Les Champignons d'Europe*. Paris, Boubée et Cie, 2 : 220-227.

– dans le cas d'un article tiré d'un ouvrage ou d'une collection signée ou patronnée par le même auteur :

MANDELS G.R., 1965 – Kinetics of fungal growth. *In* : AINSWORTH & SUSSMAN, *The Fungi*, N.Y. & London, Academic press, I : 599-612.

– dans le cas d'une thèse :

MALARD J., 1981 – Contribution à l'étude de la production d'α amylase par *Aspergillus oryzae* (Alhb.) Cohn. Thèse 3ème cycle, Lille.

– dans le cas d'un article tiré d'un compte-rendu de congrès :

MICHON E., 1982 – Virus, pollens et pollinies. *In : Anomalies polliniques liées à des facteurs parasitaires ou génétiques. Rev. Cytol. Biol. Vég., Bot., 1982, 5 : 5-19* (21ème Colloque Société Française de Phytopathologie).

ILLUSTRATIONS

Seuls les originaux seront acceptés, puisqu'en aucun cas les photocopies ne peuvent être correctement reproduites.

Les dimensions des originaux ne devront pas excéder le triple de celle de leur reproduction définitive. La justification de la revue est 11,5 x 17,5 cm.

Les tableaux étant directement reproduits par photographies, doivent être dactylographiés clairement, sans ratures ni surcharges, en s'assurant de la qualité de la frappe. Les traits doivent être tracés à l'encre et non tapés à la machine.

Les figures devront être exécutées à l'encre de Chine sur un support blanc uni (Bristol ou Calque). Les lettres et les chiffres seront soigneusement apposés à l'aide de lettres de transfert; leurs dimensions seront telles que la hauteur du plus petit caractère ne soit pas, après réduction, inférieure à 1 mm. Par contre, on veillera à éviter les lettres trop épaisses lorsque la figure ne demande pas de réduction.

On dessinera l'échelle sur la figure, les indications de grandissement (x 1500) étant prohibées. Les abréviations des mesures de longueur sont m, cm, mm et μm.

L'ensemble de ces indications est également valable pour les planches photographiques dont l'ensemble, pour une planche, doit être homogène et nettement contrasté. Chaque photographie doit illustrer un point du texte.

Les auteurs devront envoyer trois jeux de planches photographiques. L'un, destiné à la reproduction, sera composé de planches montées sur carton blanc léger, chaque photographie étant coupée à angle droit, et l'espace entre chacune d'elle ne dépassant pas 5 mm. Les deux autres jeux pourront être fournis sous forme de planches montées ou non, chaque photographie portant au dos le nom de l'auteur et le numéro de la planche.

Le tirage de planches en couleur ne pourra être accepté qu'après accord avec la secrétaire de rédaction.

o

o o

Les tirages à part sont à la charge des auteurs. Une participation aux frais de reproduction des planches photographiques est demandée.

Toute correction d'auteur (changement par rapport au manuscrit définitivement accepté par le Comité de rédaction) sera facturée.

Commission paritaire n° 58611
Dépôt légal n° 13257 - Imprimerie de Montligeon
Sortie des presses le 20 mars 1987
Imprimé en France
Directeur de la Publication : J. Nicot



CRYPTOGAMIE – MYCOLOGIE

Les manuscrits doivent être adressés (en 3 exemplaires) directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Chaque membre du Bureau se charge d'envoyer l'article à 2 membres du Comité de Lecture (ou autres lecteurs compétants).

Bien qu'étant avant tout une revue de langue française, les articles rédigés en Anglais, Allemand et Espagnol sont acceptés.

Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le 1er fascicule de chaque tome.

ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE

Tome 8, 1987

CRYPTOGAMIE comprend trois sections : ALGOLOGIE, BRYOLOGIE-LICHÉNOLOGIE, MYCOLOGIE. On peut souscrire indépendamment à chacune des sections.

Abonnement à 1 section :

France	(HT 295 F) 306,80 F
Étranger	HT 325,00 F

Abonnement aux 3 sections :

France	(HT 840 F) 873,60 F
Étranger	HT 920,00 F

Les anciens tomes et fascicules séparés de la REVUE DE MYCOLOGIE et de CRYPTOGAMIE - MYCOLOGIE sont toujours disponibles.

MÉMOIRES HORS SÉRIE

N° 2 (1942). **Les matières colorantes des champignons**, par I. Pastac. 88 pages : 15 F.

N° 3 (1943). **Les constituants de la membrane chez les champignons**, par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.

N° 6 (1958). **Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés**, par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 120 F.

N° 7 (1959). **Les champignons et nous** (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.

N° [redacted] (1966). **Catalogue de la Mycothèque** de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. (I) Micromycètes. Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.

N° [redacted] (1967). **Table des Matières** (1936-1965). 85 pages : 20 F. – (1966-1975). 30 pages : 10 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES

publiée sous la direction de M. Roger HEIM

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger Heim (1938) *(épuisé)*.

Tome II. Les Rhodophylles, par Henri Romagnesi (1941). 164 pages, 46 fig. : 90 F.

Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949). 144 pages, [redacted] fig. : 90 F.

Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar, par Marcelle Le Gal (1953). 465 pages, 172 fig. : 150 F.

Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J.P. Bassino (1965). 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 90 F.

Règlements :

- *par virement postal au nom de Cryptogamie- Revue de Mycologie 12, rue Buffon, 75005 Paris, C.C.P. PARIS 6 193 02 K;*
- *par chèque bancaire établi au même ordre.*